



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Tvorba protilátek u příjemců transfuze ve FN Motol

Alloimmunization in blood transfusion's recipients in UH Motol

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Mgr. Martin Matějček

Veronika Drunecká

Kladno 2017

Zadání bakalářské práce

Student: **Veronika Drunecká**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Tvorba protilátek u příjemců transfuze ve FN Motol**
Téma anglicky: Alloimmunization in blood transfusion's recipients in UH Motol

Zásady pro vypracování:

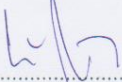
Cílem transfuzní medicíny je mimo jiné zabezpečit imunologicky kompatibilní transfuzi. Po podání transfuzních přípravků může dojít v organismu příjemce k tvorbě protilátek proti antigenům, které se nacházejí na povrchu dárcovských buněk (erytrocytů, leukocytů, trombocytů), se zároveň nevyskytují u příjemců transfuze. Jedná se o tzv. aloimunizaci. Riziko aloimunizace je různé jak u jednotlivých antigenů erytrocytárních skupinových systémů, tak u systémů leukocytárních, trombocytárních, HLA apod.. Fakultní nemocnice v Motole je na čelním místě v počtu podaných transfuzních přípravků v České republice. Nezanedbatelným nežádoucím efektem podaných transfuzí je aloimunizace zejména u polytransfundovaných pacientů. Cílem této práce je zmapovat výskyt aloprotilátek u pacientů FN Motol po podání transfuze, jejich četnost, typ, klinický význam a záchyt v závislosti na použité metodě. Vedlejším cílem práce je diskuse na téma účelnosti enzymového testu při provádění předtransfuzního vyšetření.

Seznam odborné literatury:

- [1] DANIELS, Geoff, BLACKWELL SCIENCE LTD. Human Blood Groups, ed. SECOND EDITION, UK: Blackwell Publishing Company, 2007, ISBN 978-0-6320-5646-0
- [2] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Základy imunologie, ed. 2., Praha: Triton, 2001, ISBN 807254215X, 9788072542154
- [3] ENGELFRIET, C.P. a A.J. MEULENBROEK, Imunohematologie, ed. 1., Amsterdam, NL: Sanquin Reagents, 2003, ISBN 90-5267-029-3

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Mgr. Martin Matějček


vedoucí katedry / pracoviště


děkan

V Kladně dne 31.10.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Tvorba protilátek u příjemců transfuze ve FN Motol vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2017

.....
Veronika Drunecká

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala osobám, které se podíleli na vypracování mé bakalářské práce, ať přímo či nepřímo. Největší poděkování patří panu Mgr. Martinu Matějčkovi, který dohlížel na vypracování této práce, poskytnul mi nespočet informací, které mi byly velice nápomocné, a především patří obrovské poděkování jeho trpělivosti a vstřícnosti.

Dále bych ráda poděkovala celému Oddělení krevní banky FN Motol. Díky vstřícnosti laborantek pracujících na tomto oddělení jsem měla možnost pracovat na své práci a získat potřebná data k výzkumu.

Abstrakt

V této práci se budeme zabývat odpovědí organismu na cizí antigeny, které v našem případě organismus přijímá při podání krevní transfuze pacientovi. Mimo jiné k tomuto procesu může docházet také v těhotenství při přítomnosti rozdílného antigenu matky a plodu.

Při podání krevní transfuze vzniká u příjemce vždy jisté riziko aloimunizace. Dochází tedy k tvorbě tzv. aloprotilátek, jako odpověď na antigeny, které nejsou organismu vlastní. V této práci se budeme zabývat vznikem nepravidelných protilátek (aloprotilátek) vznikajících imunizací, četností jejich výskytu a jejich vlivem na vlastní podání krevní transfuze. Nejdůležitější součástí transfuziologie je předtransfuzní vyšetření, kterým se zajišťuje pacientovi kompatibilní transfuzní přípravek. Předtransfuzní vyšetření je sledem vyšetřovacích metod vedoucích k určení správnosti transfuzního přípravku (TP). Vedlejším cílem této práce je posouzení účinnosti a potřebnosti enzymového testu v imunohematologii, který je doplňkovým testem ke stanovení nepravidelných protilátek. Enzymový test může a nemusí být součástí předtransfuzního vyšetření.

V práci se v první řadě seznámíme se základy imunologie, které jsou nezbytné pro vlastní pochopení reakce antigenu a protilátky, při podávání TP.

Další částí této práce je imunohematologie, kterou představíme jako nezbytnou součást transfuzního lékařství. Seznámíme se s nejdůležitějšími skupinovými systémy, které se mohou nacházet v organismu a které mohou hrát roli v procesu aloimunizace. Nejvýznamnějším skupinovým systémem je AB0, který je v organismu reprezentován antigeny a pravidelnými protilátkami. Dalším významným skupinovým systémem je Rh systém. Tyto dva systémy (z Rh systému antigen D) se stanovují při každém předtransfuzním vyšetření a hrají největší roli při určování správnosti kompatibility TP.

Určení kompatibility TP může být komplikované u pacientů, kteří dostávají transfuze opakovaně a mohou tedy tvořit více aloprotilátek. U těchto pacientů může být obtížné vyhledat kompatibilní transfuzní přípravek.

Klíčová slova

Aloimunizace, aloprotilátka, antigen, erytrocyt, imunologie, imunohematologie, hematologie, krevně skupinový systém, nespecifická protilátka, protilátka, předtransfuzní vyšetření, specifická protilátka, transfuziologie.

Abstract

In this bachelor thesis, we will deal with the response of the organism to foreign antigens, which in our case will receive a blood transfusion in a patient. Among other things, this process also occurs during pregnancy in the presence of a different Rh factor of the mother and baby.

When administering the transfusion, certain risks of alloimmunization are always generated by the recipient. Alloantibodies are produced in response to antigens that are not their own organism. In this thesis, we will deal with the formation of irregular antibodies resulting from immunization, the frequency of their occurrence and their effects on blood transfusion. The most important part of transfusion is a pre-transfusion examination that provides the patient with a compatible transfusion product. A pre-transfusion examination is a sequence of several methods to determine the accuracy of transfusion unit. The secondary purpose of this thesis is to assess the effectiveness of the enzyme test, which is a complementary test for the determination of irregular antibodies. The enzyme test does not need to be part of a pre-transfusion examination.

In the thesis, we will first learn the basics of immunology, which is necessary to understand for our own understanding of the antigen and antibody response when administering transfusion unit.

The other part of this thesis is immunohematology, explaining how the immunology and hematology are related, which are an essential part of transfusion medicine. We will learn about the most important group systems that can be found in the body and which can play a role in the process of alloimmunization. The most important group system is AB0, which is represented by antigens and regular antibodies in the body. Another important system is the Rh system. These two systems are determined at each pre-transfusion examination (D antigen from Rh system) and play the greatest role in determining the correctness of transfusion unit compatibility.

Determination of transfusion unit compatibility may be more complicated especially at patients with chronic illness. At these patients, repeated transfusions might be required. Some patients can get more than one antibody and it might be complicated to search the right transfusion.

Keywords

Alloantibodies, alloimmunization, antibody, antigen, erythrocyte, hematology, immunology, immunohematology, non-specific antibody, pre-transfusion test, specific antibody, transfusion.

Obsah

1	Úvod	13
2	Současný stav	15
2.1	Transfuziologie a riziko vzniku aloimunizace	15
2.2	Základy imunologie.....	15
2.1.1	Nespecifická imunita	15
2.1.2	Specifická imunita	16
2.1.3	Antigen	16
2.1.4	Protilátka	17
2.1.5	Reakce antigen – protilátka.....	20
2.1.6	Reakce vazby komplementu.....	22
2.2	Imunohematologie	24
2.2.1	Pravidelné protilátky	24
2.2.2	Nepravidelné protilátky	25
2.2.3	Chladové protilátky	25
2.2.4	Destrukce erytrocytů interakcí antigen-protilátka	26
2.3	Krevně skupinové systémy	27
2.3.1	AB0 (ABH) systém	28
2.3.2	Systém Rhesus (Rh).....	28
2.3.3	Krevně skupinový systém Kell	29
2.3.4	Krevně skupinový systém Duffy	29
2.3.5	Krevně skupinový systém Kidd.....	30
2.3.6	Krevně skupinový systém MNSs.....	30
2.3.7	Krevně skupinový systém Lewis	31

2.3.8	Krevně skupinový systém Lutheran	31
3	Cíl práce.....	33
4	Metodika	34
4.1	Antiglobulinové testy.....	34
4.1.1	Přímý antiglobulinový test (PAT, Coombsův test).....	34
4.1.2	Nepřímý antiglobulinový test (NAT).....	35
4.2	Enzymový test.....	36
4.3	Test kompatibility	37
5	Výsledky.....	38
5.1	Přehled získaných dat předtransfuzních vyšetření pacientů FN Motol .	38
5.2	Statistické vyhodnocení pozitivních a negativních testů.....	44
5.3	Statistické vyhodnocení specifických, nespecifických a chladových protilátek	45
5.4	Statistika prokázaných aloprotilátek a jejich zastoupení v jednotlivých krevně skupinových systémech.....	47
5.5	Statistické vyhodnocení positivity ET	52
6	Diskuze	56
6.1	Kazuistiky.....	57
6.1.1	Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících thalasémií, převážně u asijské rasy.	57
6.1.2	Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících thalasémií, převážně u arabské rasy	58
6.1.3	Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících thalasémií, převážně u pacientů pocházejících z Egypta....	59
7	Závěr	61

8	Seznam použitých zkratek.....	63
9	Citovaná literatura	65
10	Seznam použitých obrázků	68
11	Seznamu použitých tabulek	70

1 ÚVOD

Počátky transfuzního lékařství sahají až na začátek 20. století, kdy byl objeven první krevně skupinový systém, a to systém AB0, na základě schopnosti séra aglutinovat červené krvinky. Karl Landsteiner objevitel tohoto systému popsal skupiny krve jako A, B a C (později označována jako 0).

Rok 1940 byl dalším milníkem pro transfuzní medicínu, kdy byl objeven nový krevně skupinový systém, a to systém Rhesus. Karl Landsteiner spolu s jeho kolegou Wienerem objevili fakt, že králičí protilátky reagující s erytrocyty primáta Makak Rhesus, též reagují s lidskými erytrocyty. Konkrétně s 84 %, vzorků lidských erytrocytů tyto protilátky reagovaly (Rh pozitivní) a s 16 % nereagovaly (Rh negativní jedinci).

Objevením těchto dvou krevně skupinových systémů, ale rozvoj transfuzní medicíny nekončil. Vědec Callender objevil v roce 1945 krevně skupinový systém Lutheran.

V roce 1946 byla objevena nová protilátka vědcem Coombsem. Tato nová protilátka byla přiřazena k do té doby neznámému antigenu, a vznikl tak nový skupinový systém, klinicky velice významný, nesoucí název Kell (pojmenován po jméně pacienta u kterého byla nalezena nová protilátka). Ve stejném roce byl také popsán krevně skupinový systém Lewis.

Po prvním pacientovi, u kterého byla objevena neznámá protilátka, byl pojmenován také další nově objevený skupinový systém Duffy. Tento systém byl objeven v roce 1950 vědcem Cutbushem.

Pouze o rok později v roce 1951 byl objeven skupinový systém vědcem Allenem. Tento systém nese jméno Kidd, po první pacientce, u které byla prokázána nová protilátka.

Dalším pokrokem transfuzní medicíny bylo objevení systému MNSs. Tento systém byl úplně poprvé z části popsán již v roce 1927 vědci Landsteinerem a Levinem, kdy byly prokázány první neznámé protilátky (tito vědci v tomto roce popsali také krevně skupinový systém P). V roce 1947 pak byla objevena další

protilátka patřící do tohoto systému a uceleným systémem se stal až v roce 1951 nalezením protilátky anti-s.

Výsledkem neustálého pokroku transfuzní medicíny je 36 krevně skupinových systémů, které známe dnes, a díky kterým můžeme pacientům poskytovat maximálně imunologicky kompatibilní krevní transfuzi s minimálním rizikem potransfuzních reakcí. (16)

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Transfuziologie a riziko vzniku aloimunizace

Aloimunizace je stav, kdy dojde v organismu k rozvoji imunitní reakce, jejíž součástí je vznik specifických protilátek proti určitému antigenu. Riziko aloimunizace může být problémem též např. u těhotných žen, kdy RhD negativní matka nosí RhD pozitivní plod, kdy plod zdědí antigen D v rámci Rh systému po otci. Analogický stav může nastat i při inkompatibilitě v jiných krevně skupinových systémech, např. Kell, Kidd apod.

V této práci se ale budeme zabývat rizikem vzniku aloimunizace při podání krevní transfuze. Krevní transfuze podaná pacientovi většinou obsahuje rozdílné skupinové systémy, než jsou jeho vlastní. Tyto skupinové systémy nemají na podání a kompatibilitu krevní transfuze tak závažný vliv jako systém AB0 nebo Rh (zvláště antigen D). Pokud tedy příjemce transfuze obdrží takovou transfuzi, která díky svým rozdílným skupinovým systémům vyvolá v organismu tvorbu protilátek, proti těmto organismu nepřírozeným systémům, jedná se o aloimunizace. K bližšímu pochopení vzniku aloimunizace a vyhodnocení jistých rizik při podávání krevní transfuze je nutné se seznámit se všemi skupinovými systémy a popsat systém vzniku imunitní odpovědi organismu. (1) (2) (3) (4)

2.2 Základy imunologie

2.1.1 Nespecifická imunita

Nespecifické mechanismy nebo také neadaptivní nebo vrozené. Tyto mechanismy jsou vývojově starší, reagují v řádech minut a nemají imunologickou paměť. Jsou tvořeny složkou buněčnou a humorální. Buněčnou složku nespecifické imunity tvoří fagocytující a přirozeně cytotoxické buňky. Humorální složku nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a další sérové proteiny. Do nespecifické odpovědi mj. patří kožní epitel, monocyto-makrofágový systém a další. (1) (5)

2.1.2 Specifická imunita

Specifické mechanismy, adaptivní nebo získané. Jsou vývojově mladší, reagují v řádech dní až týdnů a mají imunologickou paměť. Mezi specifické mechanismy opět řadíme složku buněčnou a humorální. Buněčná složka je reprezentována T lymfocyty a B lymfocyty a humorální složka je reprezentována protilátkami tvořenými B lymfocyty. V obou případech se jedná o vysoce specifické molekuly reagující s cizorodou látkou. (1) (5)

2.1.3 Antigen

Antigeny jsou látky, které imunitní systém rozpozná a reaguje na ně. Spouštějí specifický ochranný mechanismus, jehož výsledkem je produkce specifické protilátky (aloprotilátky) a její vazba na uvedený antigen. Tento proces tvorby aloprotilátek, způsobený cizím antigenem se nazývá imunizace. Schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď v organismu se nazývá imunogenicitata. Vedle imunogenicity má antigen schopnost antigenicity, která umožňuje reakci s protilátkou. (6) (7)

Cizorodé antigeny, tedy antigeny z vnějšího prostředí nazýváme exoantigeny. Mezi tyto antigeny patří také alergen, které vyvolávají specifickou imunologickou reakci (alergickou reakci). Dalším exoantigenem je superantigen, který má schopnost nespecificky aktivovat velké množství lymfocytů. Antigeny vlastní organismu označujeme jako autoantigeny. (8) (2)

Antigen je velice složitá organická molekula, nacházející se na buněčné membráně. Jedná se o vysokomolekulární látky nebo nízkomolekulární látky navázané na vysokomolekulární nosič. Z chemického hlediska se jedná o bílkoviny nebo bílkoviny s polysacharidy, může se ale také jednat o lipidy nebo lipoproteiny.

Velice důležitou částí antigenu je oblast nazývaná se epitop. Tato oblast je specificky rozeznávána imunitními receptory. (6) (7)

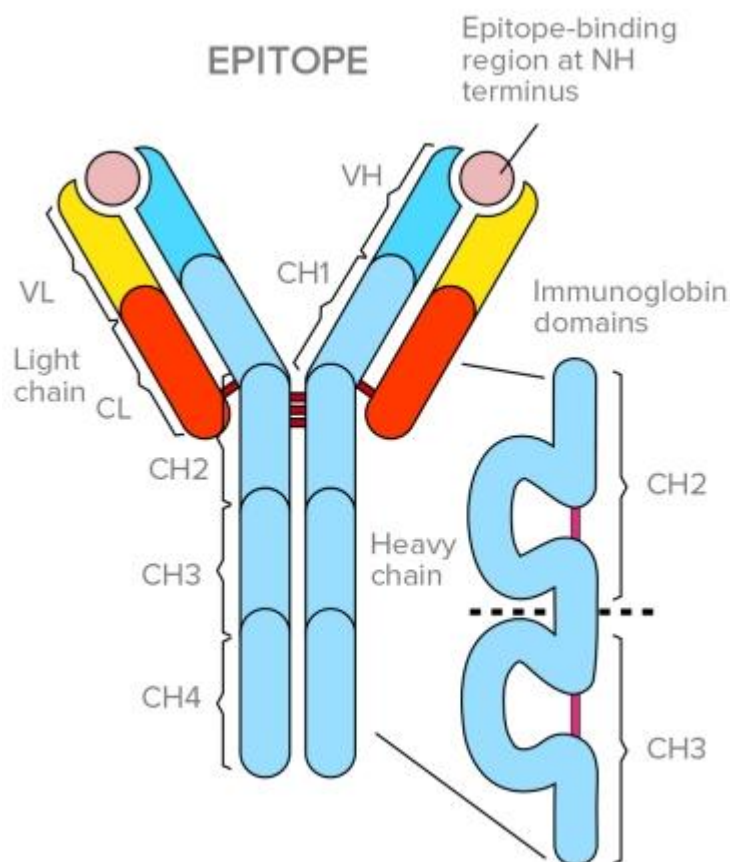
2.1.4 Protilátka

Protilátky neboli takzvané imunoglobuliny (Ig) jsou vysokomolekulární proteiny nebo také glykoproteiny a jsou součástí gamaglobulinové frakce lidského séra. Protilátky jsou tvořené B-lymfocyty a plazmatickými buňkami. (5) (8)

B lymfocyty jsou aktivovány při prvotním styku jedince s antigenem právě tímto antigenem a T pomocnými lymfocyty. Dále nastává proces, kdy se B lymfocyty diferencují na plazmatické buňky, které produkují protilátky. Tento proces se nazývá primární imunitní odpověď a řadí se do humorální složky imunitního systému. Plazmatické buňky produkují v rámci primární imunitní odpovědi IgM protilátky. IgG protilátky jsou pak produkovány až v průběhu několika následujících dní. (4) (8)

Protilátky, jsou také produkovány paměťovými buňkami, což jsou lymfocyty, které zůstávají v organismu po prvotním setkání s antigenem a nesou paměť pro příslušný antigen. Po opětovném setkání organismu s tímto antigenem jsou paměťové buňky schopné velice rychle produkovat specifické protilátky proti danému antigenu. (4) (8)

Základní strukturu imunoglobulinů tvoří dva těžké řetězce (H) nesoucí aminokyselinovou sekvenci a jeden lehký řetězec (L). Mezi dvěma těžkými řetězci se nachází kovalentní vazba, kde dochází ke spojení těchto dvou řetězců disulfidovými neboli cystinovými můstky. Tato vazba také umožňuje připojení lehkého řetězce ke každému z těžkých řetězců. Místo vazby dvou těžkých řetězců se nazývá pantová oblast. (4) (8)



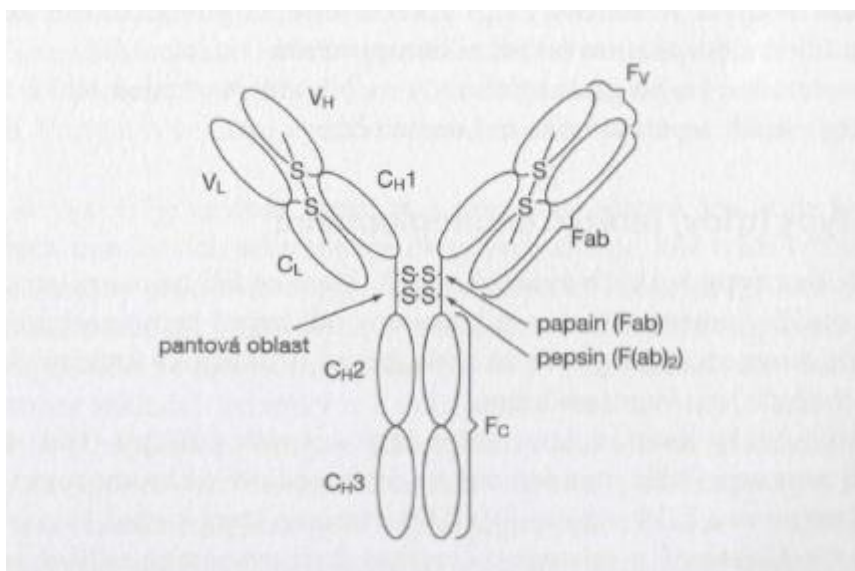
Obrázek 1 Stavba imunoglobulinu (18)

Existuje pět různých izotopů imunoglobulinů (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), tyto izotopy jsou dány rozdílnými doménami těžkého řetězce. Rozlišujeme tedy pět domén těžkých řetězců (gama, mí, alfa, delta a epsilon). Každá doména je tvořena 110–120 aminokyselinami. U lehkého řetězce rozlišujeme pouze dva druhy (lambda, kappa).

Molekula imunoglobulinu se dělí na C-konec a N-konec. Na N-konci lehkého i těžkého řetězce leží variabilní domény, které tvoří vazebné místo pro antigen. Variabilní domény jsou různé pro lehký a těžký řetězec (V_H , V_L). Ostatní domény molekuly jsou konstantní, tedy identické pro řetězce téhož typu.

Imunoglobulinová molekula obsahuje dva Fab fragmenty obsahující lehký řetězec a část těžkého řetězce. Oba tyto fragmenty jsou identické, mají schopnost vázat antigen a jsou nositeli protilátkové specifity. Fab fragment obsahuje také menší fragment Fv, nacházející se na N-konci.

Další částí molekuly imunoglobulinu je Fc fragment obsahující části obou těžkých řetězců. Tato část molekuly zajišťuje specifické biologické vlastnosti a efektorové funkce imunoglobulinu. Fc fragment slouží také pro navázání fagocytů a komplementového proteinu. (4) (8)



Obrázek 2 Strukturní části imunoglobulinu (8)

Protilátky můžeme rozdělit na protilátky přirozené, které vznikají jako reakce na membránové antigeny různých organismů vyskytujících se běžně v organismu. A dále imunní protilátky, které vznikají procesem imunizace, v průběhu těhotenství nebo při umělém kontaktu s antigenem, jedná se tedy o aloimunní protilátky, které se tvoří proti cizím antigenům. Protilátky, které vznikají, proti buňkám vlastního organismu, se nazývají autoprottilátky. (4) (6)

Dále můžeme rozdělit protilátky na pravidelné, které se vyskytují vždy u daného jedince a na protilátky nepravidelné (všechny ostatní protilátky). (9)

Obecně rozeznáváme pět izotopů imunoglobulinu (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Rozdíl mezi těmito izotopy je dán rozdílnými doménami (viz. Stavba protilátky). (2) (8)

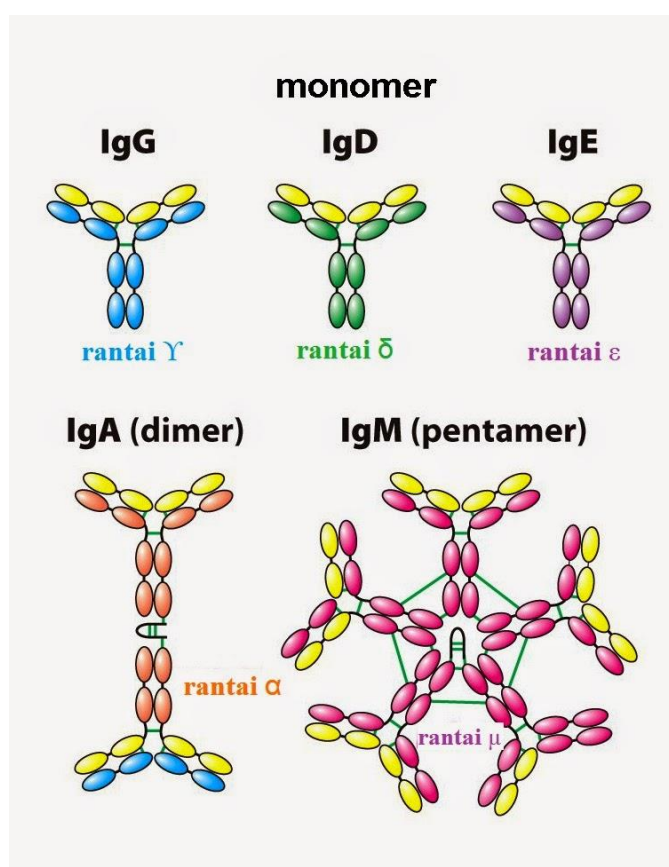
IgG protilátky se v séru vyskytují nejhojněji. Mají čtyři podtřídy (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Tyto podtřídy se liší schopností vazby komplementu. (5) (8)

IgM se v organismu vyskytuje ve formě monomeru na povrchu B buněk. Reaguje jako první při setkání s antigenem a má schopnost vázat komplement.

IgD je pentamer a stejně jako IgM se nachází na povrchu B buněk.

IgA se nachází na povrchu sliznic, ale vyskytuje se také v sérové formě. Vyskytuje se jako monomer, dimer nebo trimer. Má dvě podtřídy (IgA1, IgA2). Chrání organismus na povrchu sliznic proti mikroorganismům a funguje také jako opsonin.

IgE se vyskytuje na povrchu sliznic a v lidském séru. Hraje důležitou roli při alergických reakcích. (5) (8)



Obrázek 3 Typy imunoglobulinů (16)

2.1.5 Reakce antigen - protilátka

Tato reakce je dána komplementaritou trojrozměrné konfigurace, která je velice důležitá. Dalším faktorem jsou komplementární náboje antigenu a protilátky. Stabilita komplexu je dána vodíkovými vazbami, Van der Waalovými silami a hydrofobními vazbami. Pokud dojde k navázání protilátky na epitop antigenu,

vytvoří se tzv. imunokomplex, který je reverzibilní a sílu vazby označujeme jako afinitu. Afinitu při vazbě antigen-protilátka vyjadřuje rovnovážná (asociační) konstanta. Při vyváženém množství antigenu a protilátky je rychlost asociace rovna rychlosti disociace.

Typ síly	Vznik síly	
Elektrostatické síly	Spojení mezi opozitními náboji	$-\text{NH}_3^+ \quad \text{COO}^-$
Vodíkové můstky	Interakce atomu vodíku se dvěma elektronegativními prvky	$\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$ $\delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^-$
Hydrofobní síly	Voda vede ke shlukování hydrofobních skupin. Molekula vody přitom přechází z hydrofobního povrchu do roztoku	
Van der Waalsovy síly	Kladný a záporný náboj na opačných stranách molekuly vytvoří přitažlivou sílu mezi opačně nabitými konci	

Obrázek 4 Nekovalentní vazebné síly (2)

Specifičnost reakce je vlastností protilátek, která udává schopnost protilátky specificky reagovat pouze s jedním epitopem, tedy pouze s jedním antigenem.

Zkřížená reaktivita je vlastnost protilátky, která umožňuje reakci protilátky s více epitopy. Vazbu protilátky s antigenem ovlivňuje několik faktorů a jedním velice důležitým faktorem je teplota. Optimální teplota pro průběh reakce vazby protilátky na antigen je 37 °C. Při této teplotě dochází k destrukci erytrocytů protilátkami. Tuto schopnost mají protilátky IgG a IgM, které dokáží vázat komplement. Výjimku tvoří protilátky AB0 systému. Při vyšších teplotách může nastat situace, kdy dojde k uvolnění protilátky z vazby na antigen. Naopak protilátky, které reagují při teplotě nižší, než 30 °C se nazývají chladové protilátky.

Tento poměr musí být vyrovnaný. Rovnováha mezi množstvím antigenu a protilátky má vliv na počet komplexů, které vznikají. Pokud nastane například situace, kdy je protilátka v nadbytku, tak dochází k inhibici aglutinace.

Optimální hodnota pH pro průběh reakce je pro každou protilátku specifická. Ve většině případů je ale používaná hodnota pH 7. Pokud je hodnota pH snížena, antigen disociuje protilátku z komplexu.

„Doba inkubace je čas potřebný k dosažení rovnováhy mezi molekulami antigenu a protilátky.“ (8)

Rychlost vzniku vazby závisí na třídě imunoglobulinu a také na schopnosti protilátky navázat se na určitý antigen. Dobu inkubace je možné zkrátit přidáním dalších látek, které mohou zvýšit množství protilátek. Průběh reakce je také ovlivněn počtem epitopů anebo vzdáleností molekul. (2) (4) (5) (8) (9)

2.1.6 Reakce vazby komplementu

Komplementový systém má za úkol rozpoznat antigen, perforovat membránu a zničit buňku. Komplementový systém je složen z 30 sérových a membránových bílkovin a jedná se zejména o beta globuliny. Komplementový systém je součástí humorální odpovědi organismu. Skládá se ze sledu kaskádovitých reakcí jednotlivých složek systému. Velice důležitou roli, při reakcích komplementového systému hrají vápníkové ionty. Pokud je vápník odstraněn tak nedochází k aktivaci.

Pro komplementový systém je důležitých 9 sérových proteinů, které značíme C1 – C9. Pokud dojde k navázání protilátky vázající komplement na antigen, aktivuje se první složka systému C1. Antigenem může být například krevně skupinový antigen na erytrocytu. Složka C1 je první složka komplementového systému a váže se na protilátku. A dále se kaskádovitě aktivují další složky systému. Velice důležitá je složka C3, která obsahuje fragment C3b, který se kovalentně váže na mikrobiální povrch.

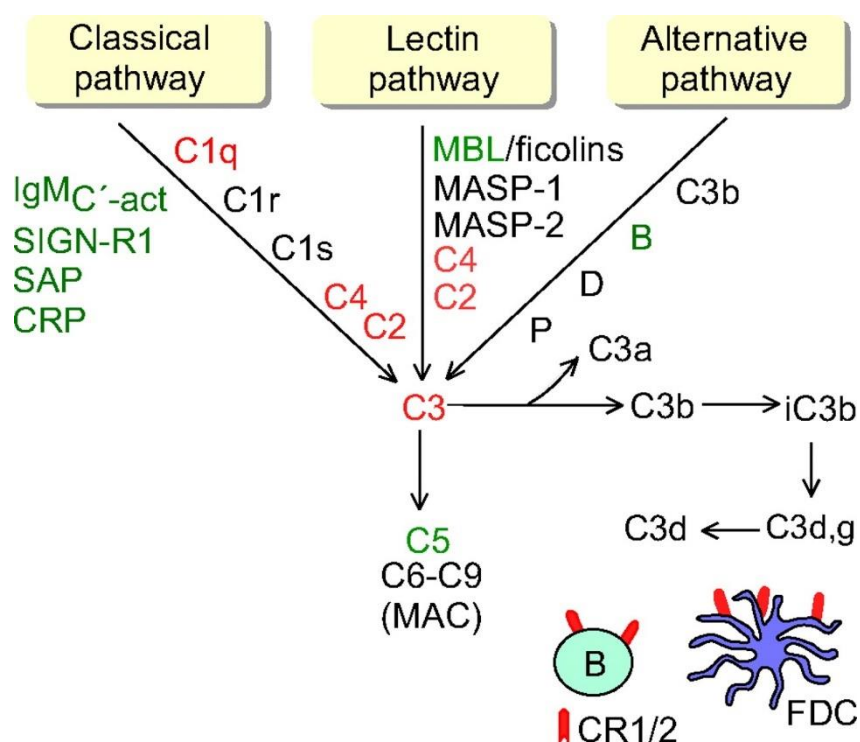
Samozřejmě, než dojde k vytvoření fragmentu C3b, dochází k aktivaci mnoha složek komplementového systému. Složka C1 aktivuje složku C4, která má podjednotky C4a a C4b, která se váže na membránu erytrocytů a dále aktivuje složku C2, která má také dvě podjednotky a to C2a, která se opět váže na membránu erytrocytů a C2b. A následně je aktivován protein C3. Pokud dojde k vytvoření faktoru C3b tak dojde ke dvěma procesům. V prvním případě se komplement neaktivuje a ukončuje se tedy kaskáda reakcí, kdy fagocytární buňky rozpoznávají faktor C3b perforují buněčnou stěnu a dochází k lýze buňky. Ve druhém procesu kaskáda reakcí pokračuje, dokud není vytvořen komplex MAC (membrane attack

complex), který se označuje jako terminální komplex kaskády reakcí. Sestává se z proteinů C5b, C6, C7, C8 a C9, které jsou aktivovány po aktivaci C3. Tento komplex opět perforuje erytrocytární membránu a dochází k destrukci buňky.

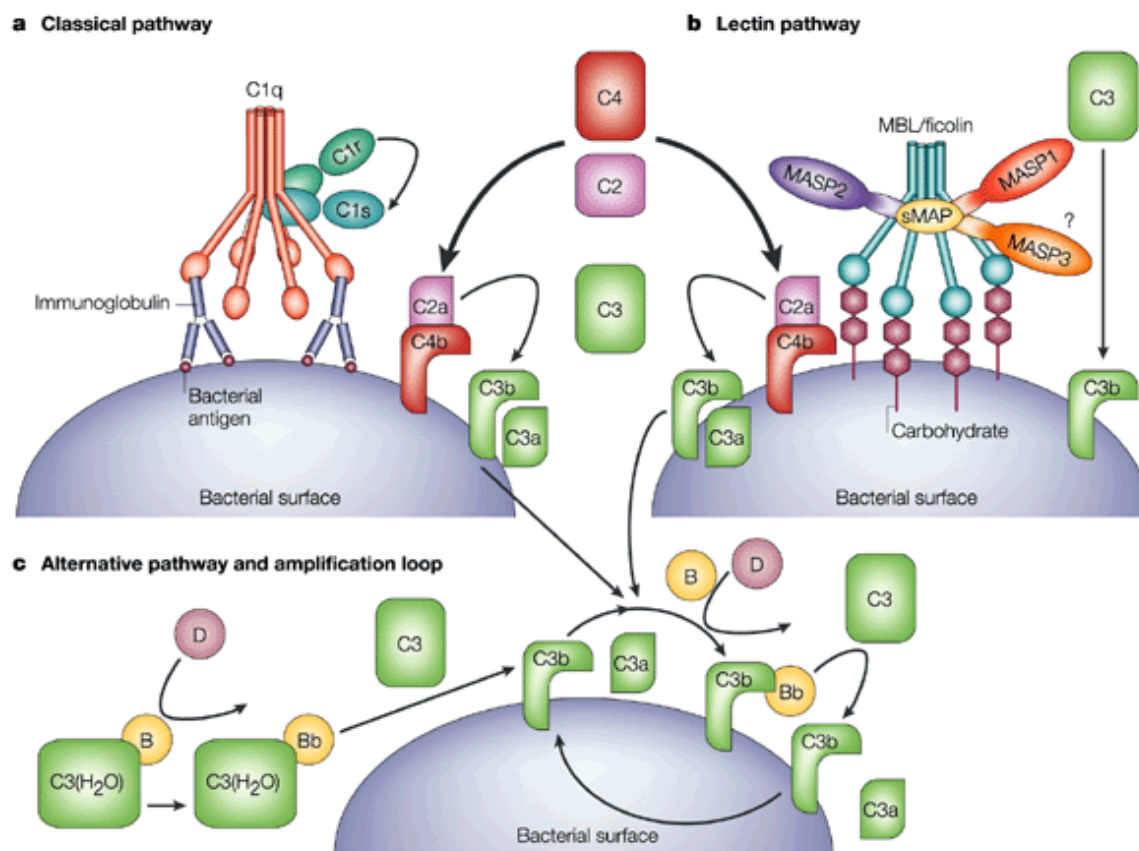
Některé imunokomplexy komplementového systému mají i další funkce. Jedná se například o aktivaci B lymfocytů, regulace transportu antigenů do sleziny a uzlin nebo mohou fungovat jako adhezivní molekuly.

Existují tři způsoby aktivace komplementového systému. Jedná se o alternativní, lektinovou a klasickou cestu aktivace.

Komplementový systém je velice účinnou ochranou v protiinfekční imunitě, může ale poškozovat také vlastní buňky. Tomuto nechtěnému poškozování lze předejít díky plazmatickým a membránovým inhibitorům, které kontrolují aktivaci komplementového systému. (1) (2) (5) (8)



Obrázek 5 Schéma tří variant aktivace komplementového systému (17)



Obrázek 6 Grafické znázornění tří variant reakce vazby komplementu (19)

2.2 Imunohematologie

Imunohematologie je nedílnou součástí transfuzního lékařství. Imunohematologie popisuje krevně skupinové systémy a interakce mezi antigeny erytrocytů a protilátek namířených proti těmto antigenům. Imunohematologie dále popisuje klinický význam výskytu těchto antigenů a protilátek v lidském organismu a jejich význam při podávání krevních transfuzí. Obrovský pokrok zaznamenalo transfuzní lékařství na začátku 20. století, díky objevení imunohematologických principů (metod a postupů) používaných v imunohematologických laboratořích. (7)

2.2.1 Pravidelné protilátky

Lidský organismus obsahuje protilátky (aglutininy), které nejsou vytvářeny imunizací, ale vlastními substancemi během prvních měsíců života. Pravidelné protilátky patří do skupinového systému AB0 a vyskytují se v lidském séru nebo v

plazmě. Organismus tedy může obsahovat ani-A, anti-B a anti-A, B. Člověk, který má na povrchu erytrocytů antigen A, tak přirozeně vytváří anti-B.

Pravidelné protilátky se stanovují v rámci každého předtransfuzního vyšetření k určení krevní skupiny příjemce. Podání krevní transfuze neshodné v AB0 systému způsobuje akutní potransfuzní hemolytickou reakci a může mít za následek smrt pacienta anebo vážné zdravotní poškození. (5) (7) (10)

2.2.2 Nepravidelné protilátky

Zatím co protilátky z krevního systému AB0 jsou pravidelné, protilátky tvořené imunizací po kontaktu s antigenem ze všech ostatních skupinových systémů jsou nepravidelné. Jedná se tedy o všechny antigeny kromě anti-A a anti-B.

Výskyt nepravidelných protilátek je velice náhodný a pro samotné podání TP nejsou protilátky ostatních skupinových systémů tak důležité jako protilátky AB0 systému nebo případně RhD. Pro tuto práci jsou ale nepravidelné protilátky velice důležité. Díky těmto protilátkám můžeme statisticky vyhodnotit frekvenci jejich výskytu a odpovědět na některé z otázek procesu aloimunizace.

Tvorbu nepravidelných protilátek, podmiňují antigeny, pocházející z krevních systémů Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd, Lewis a další. (1) (5) (7) (10)

2.2.3 Chladové protilátky

Chladové protilátky (aglutininy) jsou protilátky produkované imunitním systémem. Za nízkých teplot adherují na povrch erytrocytů a způsobují jejich destrukci což vede ke zvýšenému odbourávání erytrocytů. Pokud dochází působením chladových protilátek k výrazné degradaci erytrocytů, může docházet k autoimunitní hemolytické anémii, která se vyznačuje sníženými hodnotami erytrocytů a hemoglobinu v krvi. (11)

2.2.4 Destrukce erytrocytů interakcí antigen-protilátka

Protilátky v organismu přirozeně odstraňují cizorodé látky. V případě erytrocytů může docházet působením protilátek k jejich destrukci. Tento děj je způsoben přítomností antigenů na povrchu erytrocytů.

K destrukci erytrocytů může docházet třemi mechanismy, a to aktivací komplementu, fagocytózou erytrocytů nebo přímým ovlivněním stability membrány.

Děj degradace erytrocytů je znám jako hemolýza. Hemolýzu můžeme rozdělit na intravaskulární a extravaskulární.

Intravaskulární hemolýza je způsobená aktivací komplementové kaskády po navázání protilátky na antigeny erytrocytu. Na povrchu erytrocytu se vytvoří MAC schopný narušit erytrocytární membránu. Tento děj způsobuje únik hemoglobinu do krevního řečiště. Intravaskulární hemolýzu mohou způsobovat komplement vázající protilátky a protilátky IgM.

Při extravaskulární hemolýze dochází k degradaci erytrocytů nepřímo. K destrukci erytrocytů může docházet ve slezině nebo v játrech. Ve slezině se komplex erytrocyt-protilátka (IgG) váže pomocí Fc fragmentů protilátky na Fc receptory makrofágů. Erytrocyty jsou tak cytotoxicky destruovány na povrchu makrofágů nebo jsou fagocytovány. Při tomto procesu nedochází k aktivaci komplementové kaskády. V játrech dochází k degradaci erytrocytů aktivací komplementu. Protilátky na povrchu erytrocytů aktivují komplement, ten ale začíná až C3 složkou. Na povrchu erytrocytů zůstane navázaný C3b fragment. Tento fragment interaguje s C3b receptorem na povrchu makrofágů, dochází k adhezi erytrocytů na povrch makrofágu a následně jsou erytrocyty fagocytovány. V tomto případě tedy nedochází k přímé lýze erytrocytů. (7)

2.3 Krevně skupinové systémy

V dnešní době je známo 36 krevně skupinových systémů. Dále jsou známy také zvané krevně skupinové soubory. Antigeny jednotlivých krevně skupinových systémů se mohou vyskytovat v různých genotypech a fenotypech.

„Krevně skupinový systém se skládá z určitého počtu antigenů kódovaných jedním samostatným genem nebo více velmi těsně vázanými geny, mezi kterými se nevyskytuje crossing over s následnou genetickou rekombinací.“ (5)

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	ABO	9q34.2	
002	MNS	MNS	GYP A, GYP B, (GYPE)	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	A4GALT	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	RHD, RHCE	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	BCAM	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	KEL	7q33	CD238
007	Lewis	LE	FUT3	19p13.3	
008	Duffy	FY	ACKR1	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	SLC14A1	18q11-q12	
010	Diego	DI	SLC4A1	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	ACHE	7q22	
012	Xg	XG	XG, MIC2	Xp22.32	CD99+
013	Scianna	SC	ERMAP	1p34.2	
014	Dombrock	DO	ART4	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	AQP1	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	ICAM4	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	C4A, C4B	6p21.3	
018	H	H	FUT1	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	XK	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	GYPC	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	CD55	1q32	CD55
022	Knops	KN	CR1	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	CD44	11p13	CD44
024	Ok	OK	B5G	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	CD151	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	SEMA7A	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	GCNT2	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	B3GALNT1	3q25	
029	Gill	GIL	AQP3	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	RHAG	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	GBGT1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	ABCG2	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	ABCB6	2q36	
034	Vel	VEL	SMIM1	1p36.32	
035	CD59	CD59	CD59	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	SLC29A1	6p21.1	

Obrázek 7 Aktuální seznam krevně skupinových systémů (16)

2.3.1 AB0 (ABH) systém

V roce 1900 byl objeven, první krevně skupinový systém AB0, který má největší význam pro transfuzní lékařství. Antigeny tohoto systému se nacházejí na membráně erytrocytů a protilátky v plazmě nebo v séru.

AB0 systém udává krevní skupinu v organismu. Gen, který kóduje krevní skupinu má tři alely A, B a 0. V organismu se však projevují vždy pouze dvě z těchto tří alel. Alely A a B jsou kodominantní a alela 0 je recesivní. V organismu tedy existuje šest možných genotypů krevních skupin (AA, A0, BB, B0, 00, AB). Možnosti fenotypu jsou ale jen čtyři (A, B, AB, 0).

Organismus obsahuje pravidelné protilátky, takového antigenu, který není přítomný na membráně erytrocytů.

Antigen A má podjednotky $A_1, A_2, A_3, A_m, A_x, A_{end}, A_{int}, A_{el}$. Známé jsou také podskupiny antigenu B, a to B_3, B_x, B_m, B_L .

Protilátky pro skupinový systém AB0 jsou anti-A a anti-B, které jsou tvořeny střevní bakterií. Jedná se o přirozené, pravidelné protilátky ze třídy IgM aglutininů, vyskytující se v séru.

Stanovení krevní skupiny je hlavním a nejdůležitějším testem předtransfuzního vyšetření, zajišťující kompatibilitu krevní transfuze. Jedná se o metodu přímé aglutinace, kdy se nejprve stanovují antigeny na erytrocytech, pomocí monoklonálních protilátek.

Druhým krokem je stanovení pravidelných protilátek v séru pomocí typových erytrocytů. (1) (5) (7) (10)

2.3.2 Systém Rhesus (Rh)

Tento krevně skupinový systém má největší aloimunogenicitu. Často se tvoří IgG protilátky, které mohou způsobovat těžké HON a HTR.

Rhesus skupinový systém se vyznačuje svým polymorfismem. V rámci toho systému rozeznáváme 53 antigenů. Nejvýznamnějšími antigeny jsou D, C, c, E, e. Z těchto antigenů hraje nejdůležitější roli antigen D.

Nejvýznamnější protilátkou tohoto systému je anti-D, která se také vyznačuje nejčastějším výskytem. Protilátky anti-E a anti-D spadají mezi IgG protilátky a ostatní protilátky tohoto systému řadíme mezi IgM protilátky (C, c, E, e).

Na protilátky anti-D z krevně skupinového systému reaguje 84 % (v některých literaturách uváděno 85%) lidí, kteří jsou označováni jako RhD pozitivní. Na zbylých 16 % (nebo 15 %) erytrocyty v organismu nereagují a tito lidé jsou označováni jako Rh negativní. Toto rozdělení je dáno přítomností nebo absencí antigenu D na povrchu erytrocytů. Tento antigen se také vyznačuje svou vysokou imunogenitou.

Aloprotilátky proti antigenům ze skupinového systému RhD mají vysokou frekvenci výskytu zejména u polytransfundovaných pacientů. Všechny tyto protilátky (D, E, e, C, c) mohou být tyto protilátky detekovány pomocí NAT nebo ET. (1) (5) (7) (9)

2.3.3 Krevně skupinový systém Kell

Tento krevně skupinový systém je klinicky velice důležitý. Nejvýznamnějšími antigeny tohoto systému jsou K, k, Kp^a , Kp^b , Js^a , Js^b . Vysokou imunogenitou se vyznačuje zejména antigen K.

Protilátky tohoto systému jsou zejména imunogenní, tedy způsobeny imunizací a řadí se do třídy IgG protilátek. Nejhojněji se vyskytuje protilátka anti-K. Zvýšená tvorba protilátek tohoto systému je podmíněná opakovanými transfuzemi. Tvorba protilátek proti Kell antigenům může nastat také při těhotenství. Tyto protilátky mohou způsobovat HON a těžké HTR.

Průkazem protilátek proti Kell antigenům je NAT a může být i ET. (4) (5) (9)

2.3.4 Krevně skupinový systém Duffy

V tomto systému je známo sedm různých antigenů. Nejvýznamnějšími antigeny jsou Fy^a a Fy^b . Procentuální zastoupení neboli frekvence výskytu Duffy antigenů je rozdílná u různých populací.

Protilátky proti Duffy antigenům spadají pod IgG protilátky a v některých případech jsou schopny vázat komplement. Mohou způsobovat potransfuzní reakce a vyskytují se zejména u polytransfundovaných pacientů.

Průkazem protilátek proti Duffy antigenům je NAT. ET většinou neprokazuje protilátky z tohoto systému. (1) (7) (10)

2.3.5 Krevně skupinový systém Kidd

Tento systém je velice jednoduchý, ale zároveň může být také velice nebezpečný. Obsahuje pouze tři antigeny a z těchto tří jsou nejvýznamnější pouze dva a to Jk^a a Jk^b .

Protilátky proti antigenům krevně skupinového systému Kidd mohou být, jak jsme již zmínili velice nebezpečné. Je obtížné je detekovat, jelikož síla jejich nálezu má tendenci slábnout a také mohou způsobovat závažné HON a akutní i pozdní HTR. Tyto protilátky se tvoří imunizací, anebo při těhotenství. Protilátky tohoto systému patří do tříd IgG, nebo IgM. Mohou se vyskytovat jako autoprotilátky a také jako aloprotilátky.

Průkazem protilátek proti systému Kidd jsou NAT a může být ET. (5) (7)

2.3.6 Krevně skupinový systém MNSs

MNSs systém je velice jednoduchý. Antigeny leží na dvou lokusech, kdy na jednom leží alely M a N a na druhém lokusu leží alely S a s. V tomto krevně skupinovém systému je známo 40 antigenů, nejvýznamnějšími jsou však M, N, S a U. Velice vzácně se vyskytuje s antigen.

Nejdůležitějšími protilátkami tohoto systému jsou anti-M, anti-N, anti-S a anti-s. Anti-M a anti-N patří do třídy IgM protilátek (ve výjimečných případech také IgG) a jen zřídka jsou příčinou potransfuzní hemolytické reakce. Protilátky anti-M se mohou vyskytovat také jako chladové protilátky.

Protilátky anti-S a anti-s jsou ve většině případů imunní protilátky ze třídy IgG protilátek. Tyto protilátky mohou způsobovat potransfuzní hemolytickou reakci nebo HON.

Průkazem těchto protilátek je NAT. (5) (7) (10)

2.3.7 Krevně skupinový systém Lewis

Tento systém je velice specifický tím, že jeho antigeny nejsou tvořeny na erytrocytární membráně. Antigeny systému Lewis se vyskytují v tělních tekutinách a zejména v plazmě ze které je přibližně 30 % z nich absorbuje a následně adsorbuje na erytrocyty. Zbylé antigeny, které neadsorbují na erytrocyty, jsou ponechány v plazmě. Nejvýznamnějšími antigeny jsou Le^a a Le^b .

Protilátky anti-Le se často vyskytují při těhotenství. V tomto systému rozeznáváme protilátky anti- Le^a a anti- Le^b . Mohou se vyskytovat jako přirozeně nepravidelné (bez předchozí imunizace) anebo jako imunní protilátky. Protilátky krevně skupinového systému Lewis se mohou vyskytovat jako chladové protilátky. (5) (7) (10)

2.3.8 Krevně skupinový systém Lutheran

V systému Lutheran rozeznáváme 22 antigenů (starší publikace uvádějí 18) z nichž se většina vyskytuje v populaci ve vysoké frekvenci. Nejvýznamnějšími antigeny jsou Lu^a a Lu^b .

Významnými protilátkami jsou anti- Lu^a a anti- Lu^b , které jsou velice slabé a většinou nepůsobí potransfuzní reakce. Mohou způsobovat velice slabé pozdní HTR nebo HON. Tyto protilátky se v organismu vyskytují ve formě imunních i přirozeně nepravidelných protilátek. 99.8 % populace obsahuje antigen Lu^b a je tedy velice obtížné zajistit imunologicky kompatibilní krevní transfuzi člověku, který obsahuje anti- Lu^b protilátky. (1) (5) (7)

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zmapovat a vyhodnotit frekvenci výskytu a zastoupení specifických aloprotilátek u pacientů Fakultní nemocnice Motol. Výsledkem práce tedy bude statistické vyhodnocení jednotlivých protilátek z jednotlivých krevně skupinových systémů u pacientů FN Motol v období 2015–2016.

Vedle prokázaných specifických protilátek je u pacientů při vyšetření prokázáno také velké množství nespecifických protilátek. Tento fakt je do určité míry ovlivněn prováděním enzymového testu, který udává často falešně pozitivní výsledky. Ze získaných dat a statistickým vyhodnocením těchto dat se tedy pokusím odpovědět na často diskutovanou otázku, zda je enzymový test nezbytný pro imunohematologická vyšetření.

4 METODIKA

K detekci protilátek proti erytrocytům se využívají sérologické metody. Jedná se o imunohematologická vyšetření, založená na principu aglutinace (přímá/nepřímá).

Pro stanovení erytrocytárních antigenů se využívají diagnostická séra. A k detekci protilátek (v plazmě/séru) se využívají diagnostické erytrocyty.

Primárně se stanovují antigeny A, B, protilátky anti-A, anti-B a přítomnost či nepřítomnost RhD antigenů. Antigeny ostatních krevně skupinových systémů se stanovují v případě potřeby. Jedná se o situace, kdy má dárce vzácný fenotyp, u polytransfundovaných pacientů nebo pokud se jedná o příjemce krevní transfuze, který již má prokázané aloprotilátky.

4.1 Antiglobulinové testy

Antiglobulinové testy jsou základním vyšetřením při stanovení protilátek proti erytrocytům.

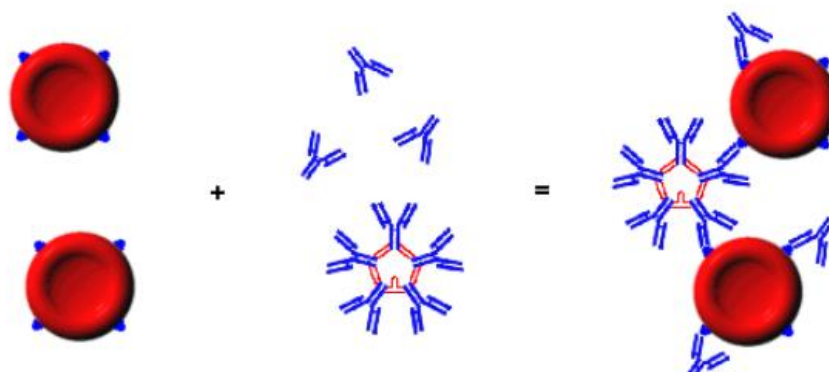
4.1.1 Přímý antiglobulinový test (PAT, Coombsův test)

Jedná se o metodu pomocí kterého lze detekovat protilátky přítomné na erytrocytech. K provedení PAT testu se využívají erytrocyty pacienta. PAT testem stanovujeme IgG protilátky nebo složky komplementu (C3d) navázané na erytrocyty pacienta in vivo. Pomocí PAT lze také detekovat i IgA a IgM protilátky na povrchu erytrocytů.

Princip PAT je založen na přímé aglutinaci. Aglutinace je ukazatelem přítomnosti nepravidelných protilátek v séru pacienta. Pokud je výsledek PAT pozitivní, je možné provést další vyšetření, zaměřené na identifikaci navázaných protilátek na povrchu erytrocytu (eluční test).

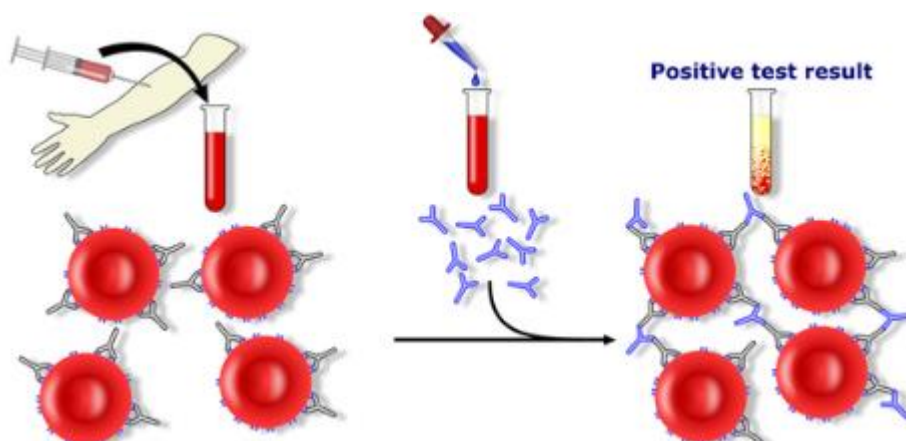
K vyšetřovaným erytrocytům se přidává specifické antiglobulinové sérum AGH (anti-IgG + anti-C3d). AGH je polyspecifické sérum, pokud dojde k pozitivnímu výsledku, lze použít monospecifické sérum anti-IgG a anti-C3d (použití odděleně). Případně se využívá také anti-IgA, anti-IgM a anti-C3b.

PAT lze provést zkumavkovým testem nebo sloupcovou aglutinací.



Obrázek 8 K erytrocytům s antigenem je přidána protilátka proti antigenu, která se váže na erytrocyty, která mají na povrchu specifické antigeny. Tím dochází k aglutinaci erytrocytů, eventuálně k aktivaci komplementu. (21)

PAT se používá při AIHA, HON, hemolytické potransfuzní reakci nebo u skupinově neshodné transplantace.



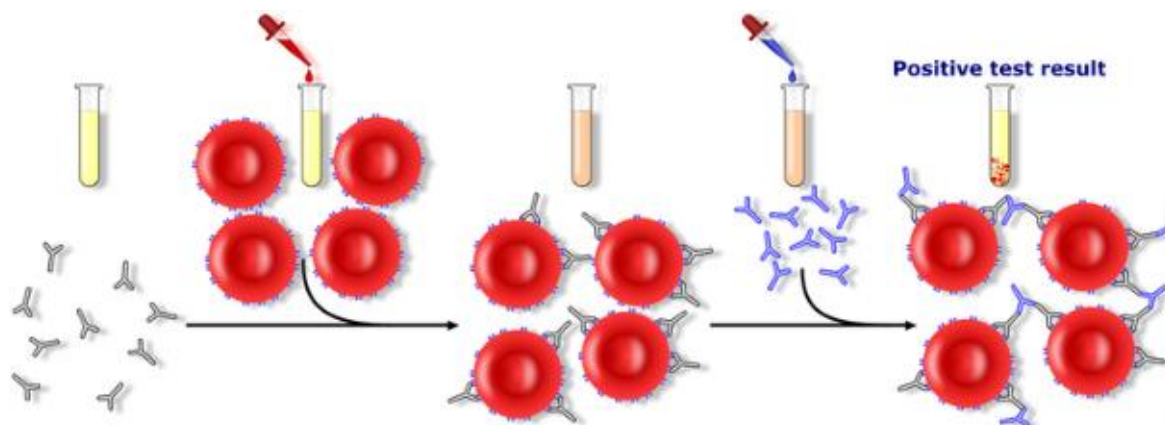
Obrázek 9 Schéma přímého antiglobulinového testu (22)

4.1.2 Nepřímý antiglobulinový test (NAT)

Tento test je schopen detekovat všechny klinicky významné protilátky, a je standardem pro předtransfuzní vyšetření. Tento test se provádí buď na pevné fázi nebo sloupcovou aglutinací. NAT je možno provádět také zkumavkovou metodou. Jedná se o screeningové vyšetření k detekci nepravidelných protilátek proti antigenům na povrchu erytrocytů (z jiných systémů než AB0).

NAT test je použitelný i při laboratorní diagnostice AIHA, kdy jedinec vytváří protilátky proti vlastním antigenům (autoprotiilátky).

Doplňkovým testem NAT je enzymový test (ET)



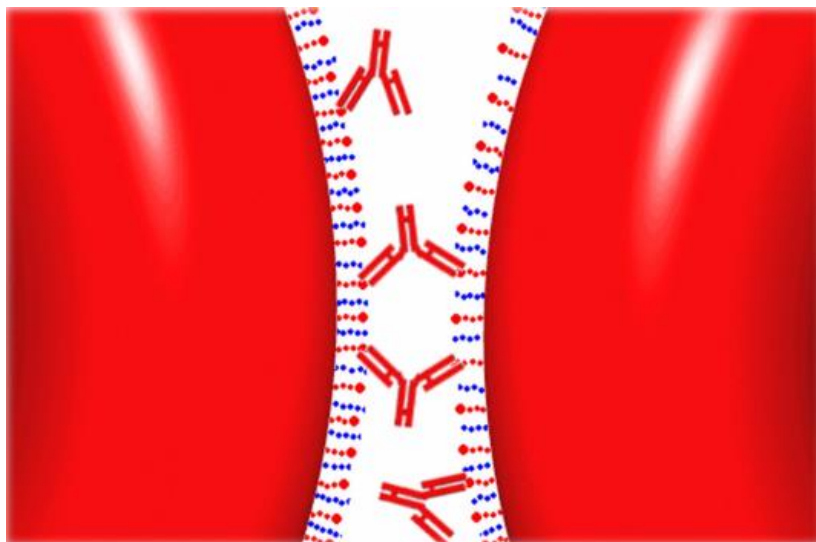
Obrázek 10 Schéma nepřímého antiglobulinového testu (22)

4.2 Enzymový test

Enzymový test je doplňkovým testem NAT. Využívá se k detekci aloprotiilátek.

Enzymový test se provádí ve screeningovém panelu diagnostických erytrocytů. Používají se erythrocyty upravené za pomoci proteolytického enzymu. Enzymy, které štěpí specificky peptidovou vazbu se nazývají proteázy (bromelin, ficin, papain). Specifičtějšími enzymy, avšak v praxi nepoužívanými jsou trypsin a chymotrypsin.

Principem je přiblížení erytrocytů na velice malou vzdálenost, kdy dochází pomocí protilátky ke spojení dvou erytrocytů (aglutinace). Enzymový test může odhalit některé antigeny (odštěpení molekuly kyseliny sialové a odhalení vazebného místa), které nemusí prokázat jiný test (většinou antigeny Rh). Na druhou stranu, ale může dojít k destrukci některých antigenů. Tento test tedy nemusí být jednoznačný pro stanovení klinicky významných aloprotiilátek. Pozitivita testu může být dána průkazem nespecifických, tedy klinicky nevýznamných protilátek.



Obrázek 11 Princip aglutinace při enzymovém testu (21)

4.3 Test compatibility

Test compatibility nebo také slučitelnosti se provádí standardně v NAT. Tento test ověřuje kompatibilitu mezi plazmou/sérem pacienta/příjemce a erytrocyty krevní transfuze/dárce. Tento test též kontroluje kompatibilitu AB0 mezi příjemcem a dárce erytrocytů.

		Dárce							
		0-	0+	B-	B+	A-	A+	AB-	AB+
Příjemce	AB+	🔴	🔴	🔴	🔴	🔴	🔴	🔴	🔴
	AB-	🔴		🔴		🔴		🔴	
	A+	🔴	🔴			🔴	🔴		
	A-	🔴				🔴			
	B+	🔴	🔴	🔴	🔴				
	B-	🔴		🔴					
	0+	🔴	🔴						
	0-	🔴							

Obrázek 12 Kompatibilita krevně skupinových systémů AB0 a RhD (22)

5 VÝSLEDKY

Ze záznamů Oddělení krevní banky FN Motol jsme získali data za rok 2015 a 2016 o počtu provedených předtransfuzních vyšetření, zjištěných specifických, nespecifických či chladových protilátek. Dále jsme získali počty jednotlivých zjištěných specifických aloprotilátek a jejich zastoupení v jednotlivých krevně skupinových systémech. (12)

Ze získaných dat jsme rozdělili počty provedených vyšetření na dospělé a děti (děti různých věkových kategorií) a na muže a ženy.

Dále jsme získali počet pozitivních enzymových testů (ET), které ve většině případů signalizovaly pouze nespecifické protilátky, na druhou stranu ale v několika testech prokázal specifickou protilátku pouze pozitivní ET.

A v neposlední řadě jsme získali také počet vyšetřených onkologických a hematoonkologických pacientů.

V této kapitole nalezneme statisticky vyhodnocená získaná data. Tato data jsou vynesena v tabulkách a k většině tabulek je pro znázornění přiřazen graf. Jelikož tato práce vychází z dat za rok 2015 a 2016, budeme vždy porovnávat rozdíly v hodnotách dat mezi těmito dvěma roky.

5.1 Přehled získaných dat předtransfuzních vyšetření pacientů FN Motol

V tomto přehledu jsou shrnuta všechna získaná data vynesena v tabulkách a grafech.

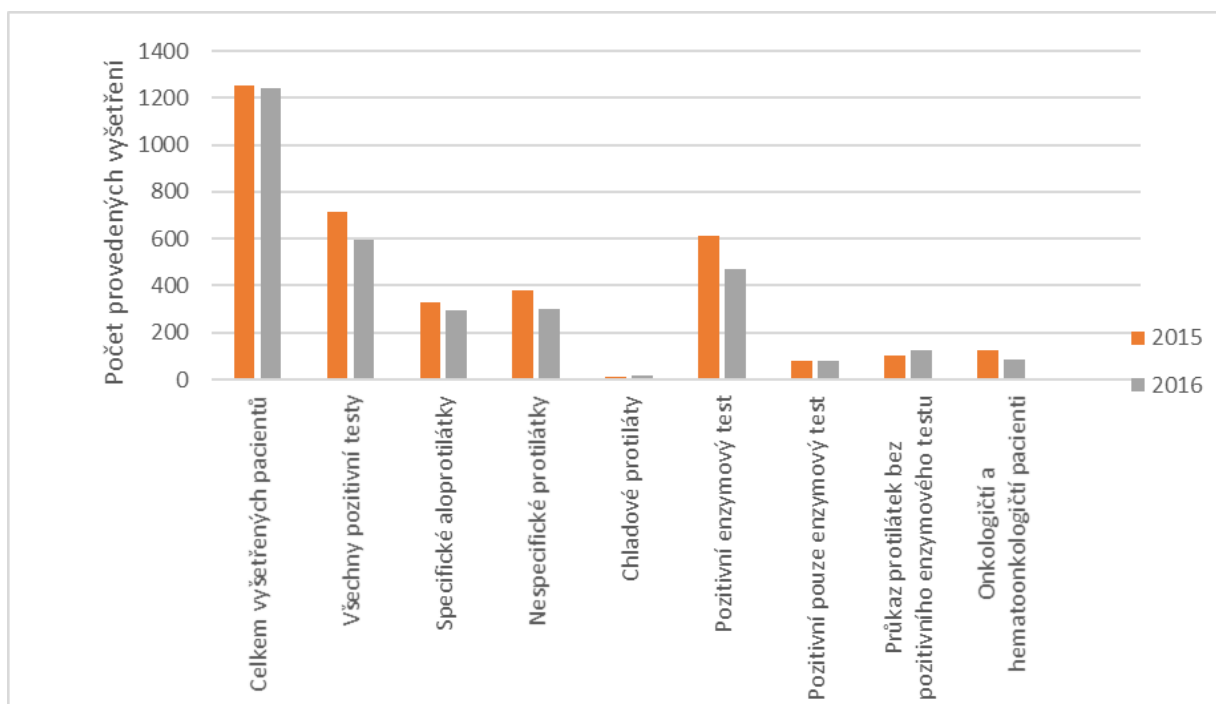
Jako první jsou zde v tabulce vynesena základní získaná data počtu všech provedených vyšetření, počet pozitivních testů, prokázané specifické, nespecifické či chladové protilátky, pozitivita ET a počet onkologických a hematoonkologických pacientů. U onkologických a hematoonkologických pacientů se může jednat o polytransfundované pacienty. U těchto pacientů je tedy velice důležitý screening protilátek, protože mohou tvořit další aloprotilátky, což je způsobené opakovaným podáváním krevních transfuzí. U těchto pacientů se tedy může vyskytovat více

aloprotilátek a není snadné pro ně najít tu nejvhodnější krevní transfuzi, právě díky procesu aloimunizace. Jako prevence tvorby aloprotilátek jsou ve FN Motol všichni dětské hematoonkologičtí pacienti ihned po přijetí otypováni na antigeny Rh-Kell systému a u každé transfuze erytrocytů je tento systém dodržován při výběru erytrocytů k transfuzi. Pacienti s autoprotilátkou, u kterých je nutné provádět vysycení séra vlastními erytrocyty, za účelem zjištění přítomnosti skrytých aloprotilátek či negativního testu kompatibility jsou otypováni i na další antigeny, které jsou poté při transfuzi dodržovány (zejména Kidd). Opakované podávání krevní transfuze pacientovi tedy může zvyšovat riziko aloimunizace. Tuto příčinu aloimunizace můžeme také zaznamenat u polytransfundovaných pacientů trpících vrozenými chorobami, jako jsou například útlumy krvetvorby.

Tabulka 1 Množství jednotlivých provedených vyšetření za rok 2015 a 2016

Období	2015	2016
Celkem vyšetřených pacientů	1254	1239
Všechny pozitivní testy	713	594
Specifické aloprotilátky	331	294
Nespecifické protilátky	382	300
Chladové protilátky	12	17
Pozitivní enzymový test	612	472
Pozitivní pouze enzymový test	82	79
Průkaz protilátek bez pozitivního enzymového testu	101	122
Onkologičtí a hematoonkologičtí pacienti	124	87

Pro lepší představu jsou data z tabulky vynesena v následujícím grafu, kde můžeme vidět jednotlivé hodnoty za rok 2015 a 2016. Můžeme zde zaznamenat rozdíly mezi těmito roky.



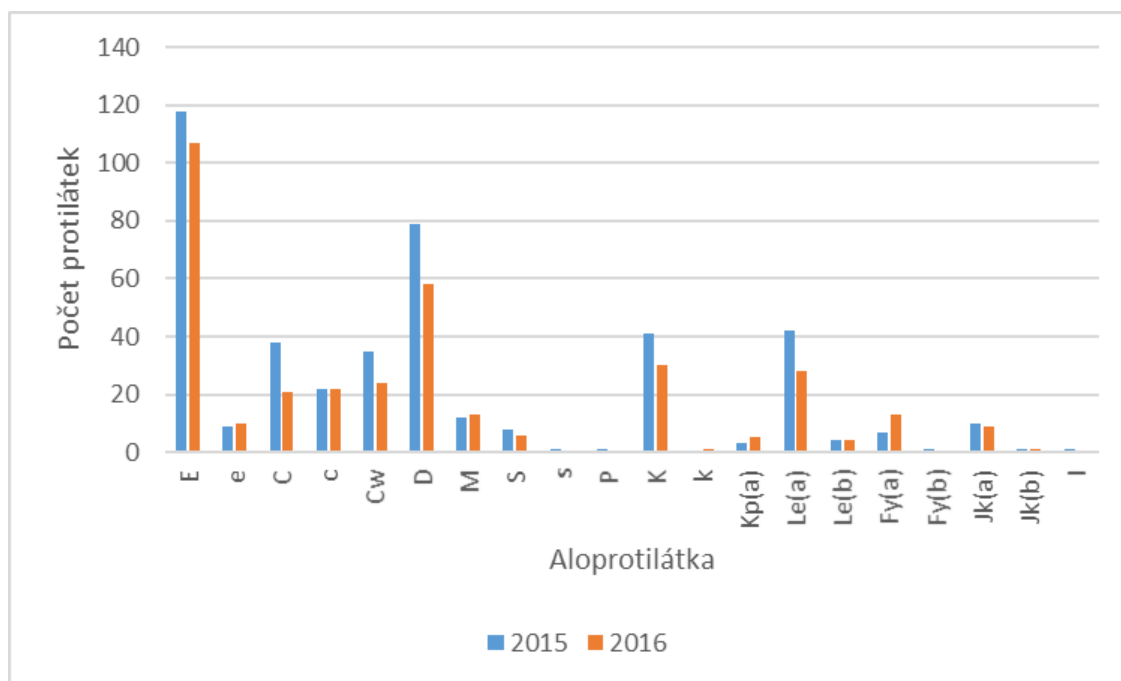
Obrázek 13 Graf 1 Graf tabulce 1

V další tabulce jsou vynesena data jednotlivých prokázaných aloprotilátek opět za rok 2015 a 2016. Názvy aloprotilátek jsou řazeny dle krevně skupinových systémů. Opět je zde možné zaznamenat drobné rozdíly mezi získanými daty pro rok 2015 a 2016.

Tabulka 2 Zjištěné aloprotilátky za rok 2015 a 2016

E	118	107
e	9	10
C	38	21
c	22	22
Cw	35	24
D	79	58
M	12	13
S	8	6
s	1	0
P	1	0
K	41	30
k	0	1
Kp(a)	3	5
Le(a)	42	28
Le(b)	4	4
Fy(a)	7	13
Fy(b)	1	0
Jk(a)	10	9
Jk(b)	1	1
I	1	0

Data z Tabulky 2 jsou vyneseny v nasledujícím grafu, kde můžeme vidět rozdíly mezi jednotlivými roky.



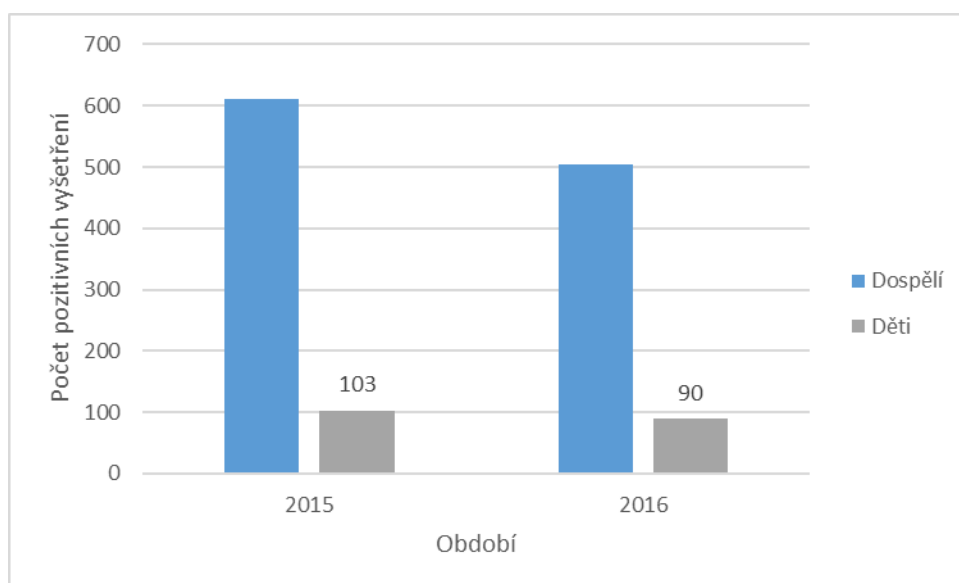
Obrázek 14 Graf 2 Graf k tabulce 2 – zastoupení jednotlivých prokázaných aloprotilátek za rok 2015 a 2016

Jako další jsme rozdělili získaná data na dospělé a děti a na muže a ženy. Děti jsou rozděleny dle věkových kategorií. Tato data vychází ze všech pozitivních testů z celkového počtu provedených vyšetření. U všech pacientů z následující tabulky byly testy pozitivní na specifické, nespecifické či chladové protilátky.

Tabulka 3 Přehled počtů dospělých a dětí z pozitivních vyšetření

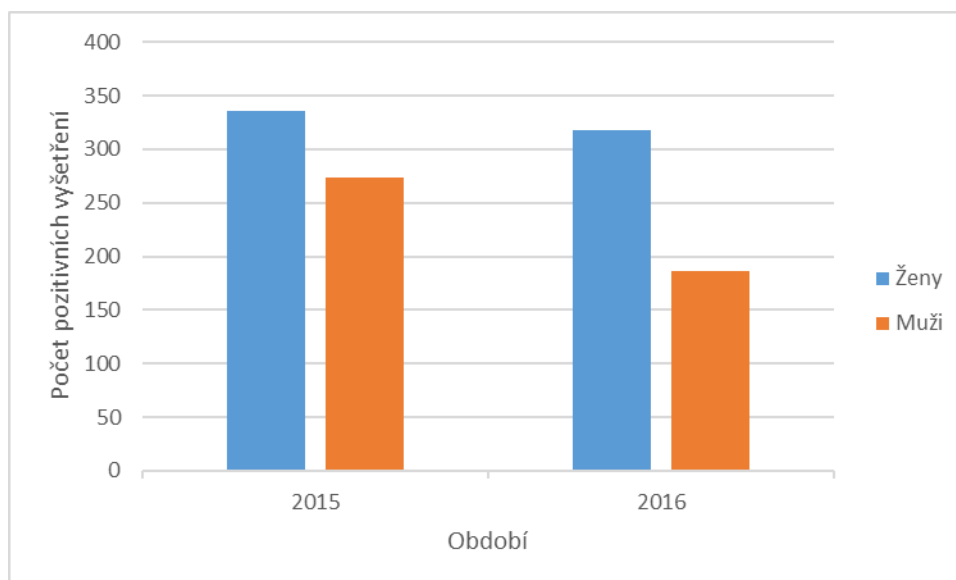
Období	Dospělí	Období	Muži	Ženy	Děti celkem	Děti 0-1	Děti 2-6	Děti 7-15	Děti 16-18
2015	610	2015	274	336	103	33	28	21	21
2016	504	2016	186	318	90	14	27	32	17

Následující graf znázorňuje poměr mezi pozitivními testy u dětí a dospělých za rok 2015 a 2016.



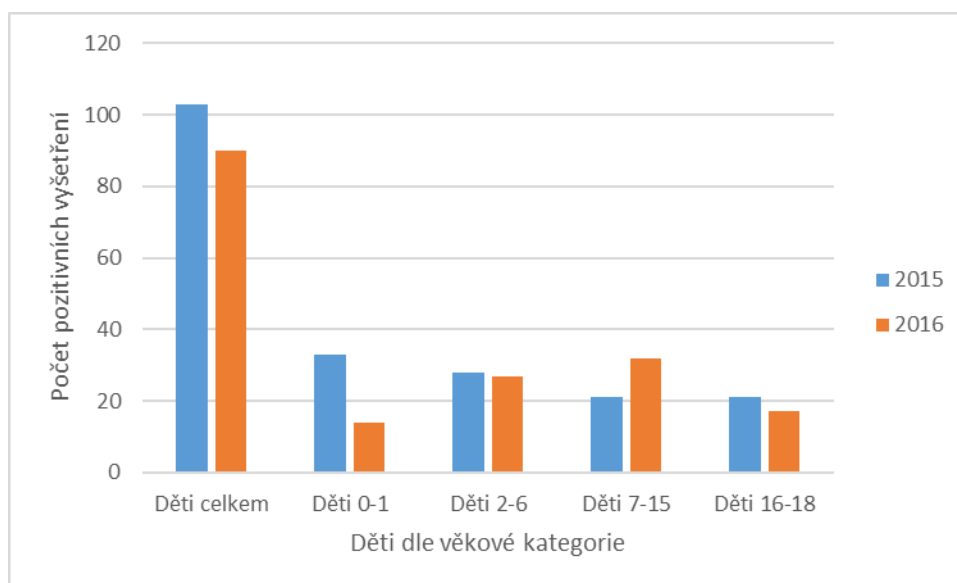
Obrázek 15 Graf 3 Znázornění rozdílu mezi počtem pozitivních testů u dětí a dospělých

Další graf znázorňuje počty všech pozitivních vyšetření pro muže a ženy v jednotlivých letech.



Obrázek 16 Graf 4 Znáznornění počtu pozitivních vyšetření u mužů a žen za rok 2015 a 2016

Pro znázornění pozitivních vyšetření u dětí jsme v grafu vynesli nejprve celkový počet dětí a následně jsou v grafu vynesena data pro jednotlivé věkové kategorie dětí.



Obrázek 17 Graf 5 Znáznornění pozitivních vyšetření dle věkové kategorie dětí za rok 2015 a 2016

5.2 Statistické vyhodnocení pozitivních a negativních testů

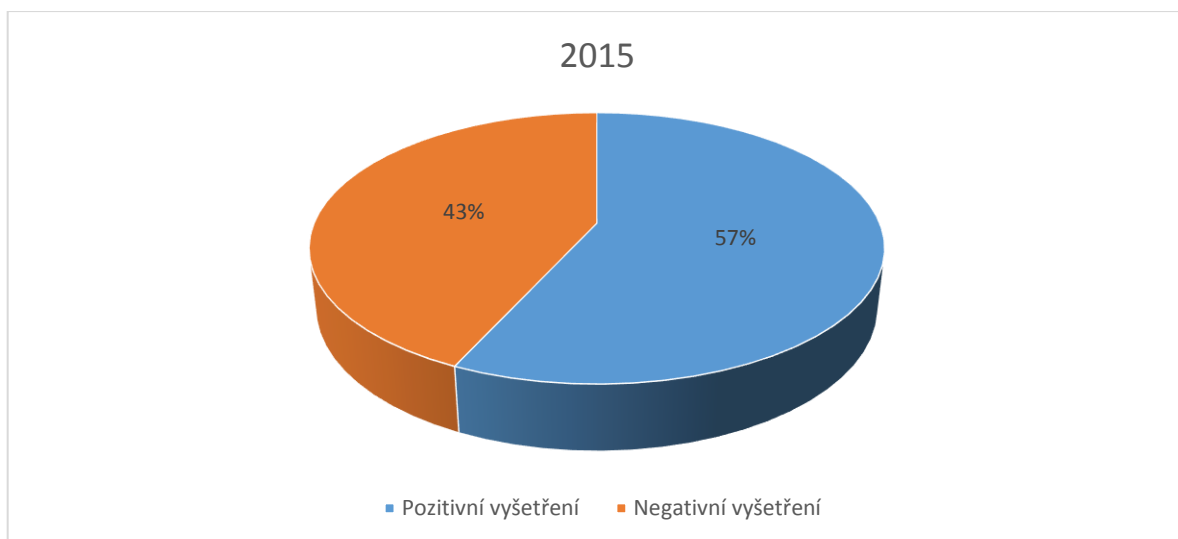
Tato kapitola obsahuje tabulky a grafy udávající počty pozitivních a negativních vyšetření z celkového počtu provedených vyšetření za rok 2015 a 2016. Počty vyšetření jsou pro lepší představu a přehled převedena na procenta.

Tabulka 4 Množství všech provedených vyšetření a množství pozitivních a negativních vyšetření

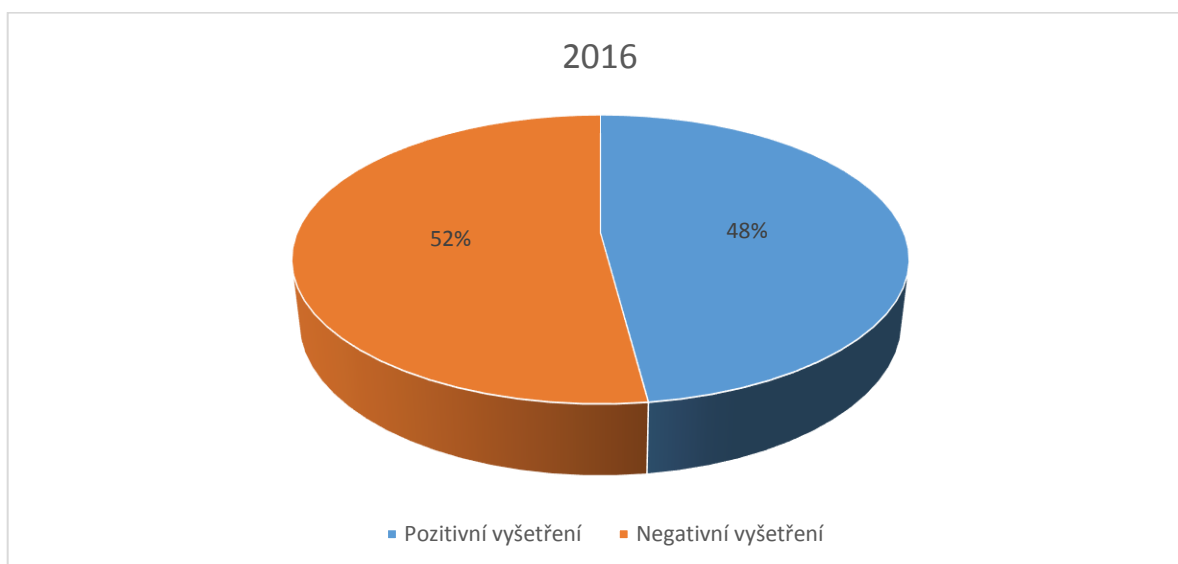
Období	2015	2016
Celkem vyšetřených pacientů	1254	1239
Celkem vyšetřených pacientů [%]	100%	100%
Pozitivní výsledky	713	594
Pozitivní výsledky [%]	57%	48%
Negativní výsledky	541	645
Negativní výsledky [%]	43%	52%

Jak si můžeme všimnout v Tabulce 4, počet provedených vyšetření v jednotlivých letech je téměř stejný. Počet pozitivních výsledků testů, je ale cca o sto testů nižší v roce 2016. Tím je tedy způsobeno, že počet negativních výsledků je o toto množství vyšší za rok 2016. V roce 2015 tedy bylo více pozitivních výsledků testů, oproti tomu v roce 2016, bylo větší množství negativních testů.

Následující grafy znázorňují procentuální zastoupení pozitivních a negativních výsledků za rok 2015 a 2016. Grafy vychází z faktu, že 100 % je počet všech provedených vyšetření za rok 2015 a 2016. Tyto hodnoty nalezneme v Tabulce 4.



Obrázek 18 Graf 6 Porovnání pozitivních a negativních testů ze všech provedených vyšetření za rok 2015



Obrázek 19 Graf 7 Porovnání pozitivních a negativních testů ze všech provedených vyšetření za rok 2016

5.3 Statistické vyhodnocení specifických, nespecifických a chladových protilátek

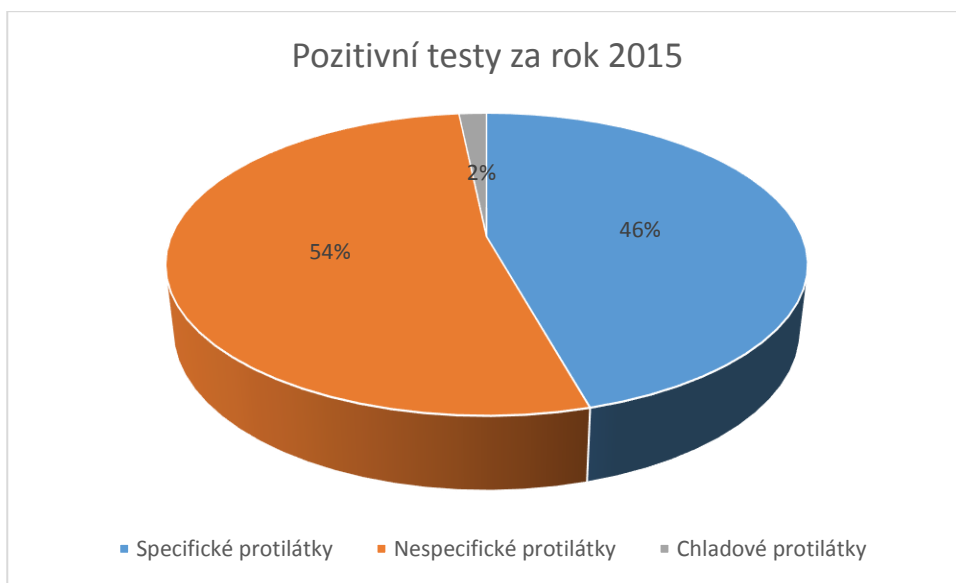
Tato kapitola shrnuje a porovnává počet pozitivních testů. Do pozitivních testů řadíme výsledky prokazující specifickou aloprotilátky, nespecifické protilátky a chladové protilátky. První tabulka obsahuje počty pozitivních výsledků vyšetření. Vychází tedy z faktu, že za rok 2015 bylo 713 pozitivních vyšetření a v roce 2016 bylo

594 pozitivních vyšetření. Jak si můžeme všimnout, již zde zaznamenáváme rozdíl mezi rokem 2015 a 2016 a to přibližně o sto pozitivních vyšetření.

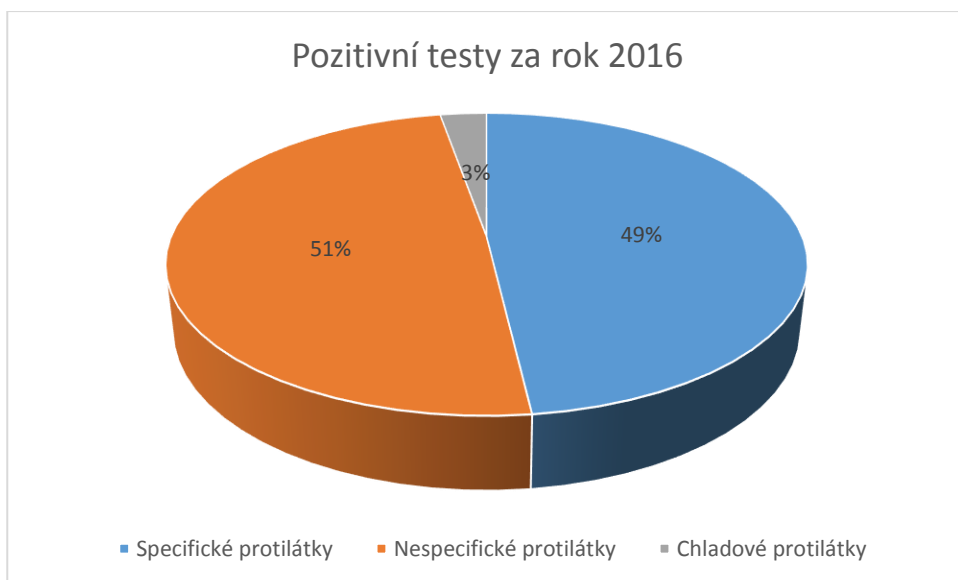
Tabulka 5 Zastoupení specifických, nespecifických a chladových protilátek ze všech pozitivních vyšetření za rok 2015 a 2016

Pozitivní testy za rok 2015			
	Specifické protilátky	Nespecifické protilátky	Chladové protilátky
Pozitivní testy	331	382	12
Pozitivní testy [%]	46%	54%	2%
Pozitivní testy za rok 2016			
Pozitivní testy	294	300	17
Pozitivní testy [%]	49%	51%	3%

Informace z Tabulky 5 máme znázorněné v následujících dvou grafech. Počet chladových protilátek je zahrnut mezi specifické protilátky, proto v grafu způsobují hodnotu celku nad 100 %. Počet chladových protilátek je v grafu znázorněn pro představu a porovnání s množstvím specifických a nespecifických protilátek.



Obrázek 20 Graf 8 Zastoupení prokázaných protilátek ze všech pozitivních testů za rok 2015



Obrázek 21 Graf 9 Zastoupení prokázaných protilátek ze všech pozitivních testů za rok 2016

V obou předchozích grafech je velice viditelný poměr prokázaných specifických protilátek a nespecifických protilátek ze všech pozitivních vyšetření. Můžeme tedy vidět, že v roce 2015 i 2016 bylo u více než poloviny pozitivní vyšetření, ovšem s neprokázanou specifickou protilátkou.

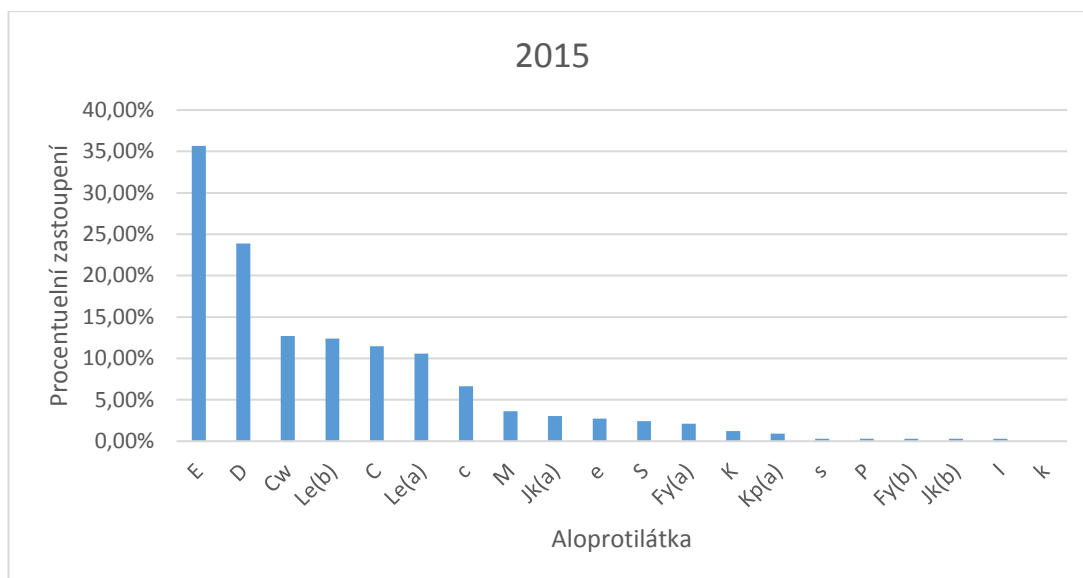
5.4 Statistika prokázaných aloprotilátek a jejich zastoupení v jednotlivých krevně skupinových systémech

V předchozí kapitole byl znázorněn poměr prokázaných specifických protilátek a nespecifických protilátek. Nyní se budeme zabývat pouze prokázanými aloprotilátkami a jejich zastoupením v krevně skupinových systémech.

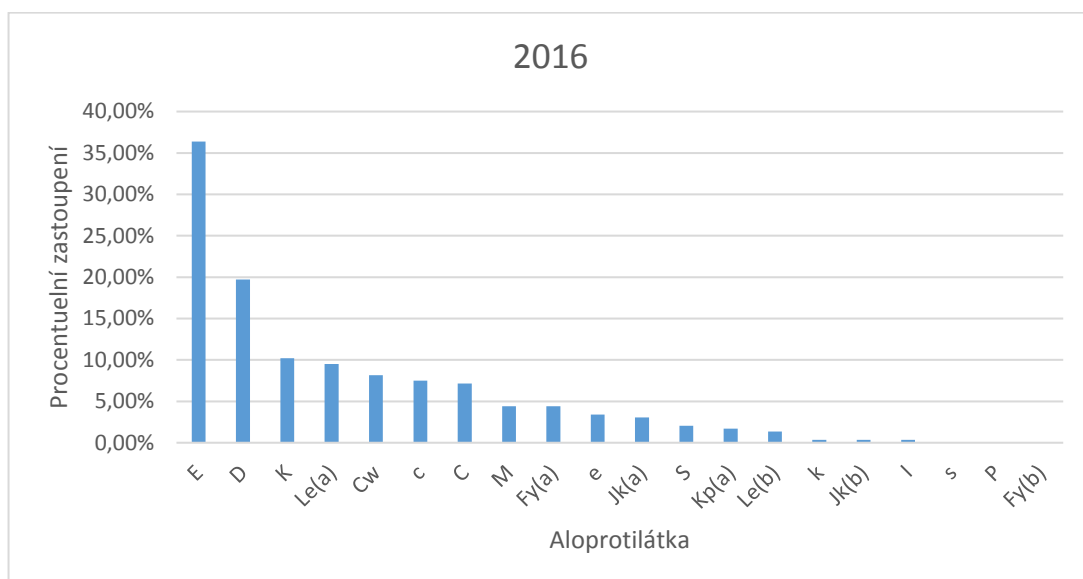
Tabulka 6 Seznam prokázaných aloprotilátek za rok 2015 a 2016

Aloprotilátky za rok 2015				Aloprotilátky za rok 2016			
E	35,65%	E	35,65%	E	36,39%	E	36,39%
e	2,72%	D	23,87%	e	3,40%	D	19,73%
C	11,48%	Cw	12,69%	C	7,14%	K	10,20%
c	6,65%	Le(b)	12,39%	c	7,48%	Le(a)	9,52%
Cw	12,69%	C	11,48%	Cw	8,16%	Cw	8,16%
D	23,87%	Le(a)	10,57%	D	19,73%	c	7,48%
M	3,63%	c	6,65%	M	4,42%	C	7,14%
S	2,42%	M	3,63%	S	2,04%	M	4,42%
s	0,30%	Jk(a)	3,02%	s	0,00%	Fy(a)	4,42%
P	0,30%	e	2,72%	P	0,00%	e	3,40%
K	1,21%	S	2,42%	K	10,20%	Jk(a)	3,06%
k	0,00%	Fy(a)	2,11%	k	0,34%	S	2,04%
Kp(a)	0,91%	K	1,21%	Kp(a)	1,70%	Kp(a)	1,70%
Le(a)	10,57%	Kp(a)	0,91%	Le(a)	9,52%	Le(b)	1,36%
Le(b)	12,39%	s	0,30%	Le(b)	1,36%	k	0,34%
Fy(a)	2,11%	P	0,30%	Fy(a)	4,42%	Jk(b)	0,34%
Fy(b)	0,30%	Fy(b)	0,30%	Fy(b)	0,00%	I	0,34%
Jk(a)	3,02%	Jk(b)	0,30%	Jk(a)	3,06%	s	0,00%
Jk(b)	0,30%	I	0,30%	Jk(b)	0,34%	P	0,00%
I	0,34%	k	0,00%	I	0,34%	Fy(b)	0,00%

V Tabulce 6 je znázorněné procentuální zastoupení jednotlivých aloprotilátek prokázaných u pacientů FN Motol. Ve druhém sloupci jsou aloprotilátky řazeny od nejčastěji se vyskytujících v daném roce po nejméně se vyskytujících. Je zajímavé, že v každém roce se stejné aloprotilátky vyskytují s různou frekvencí výskytu. Například aloprotilátka D je z hlediska frekvence výskytu v roce 2016 na druhém místě, zatímco v roce 2015 je až na 6 místě.



Obrázek 22 Graf 10 Znáznornění frekvence výskytu prokázaných aloprotilátek za rok 2015



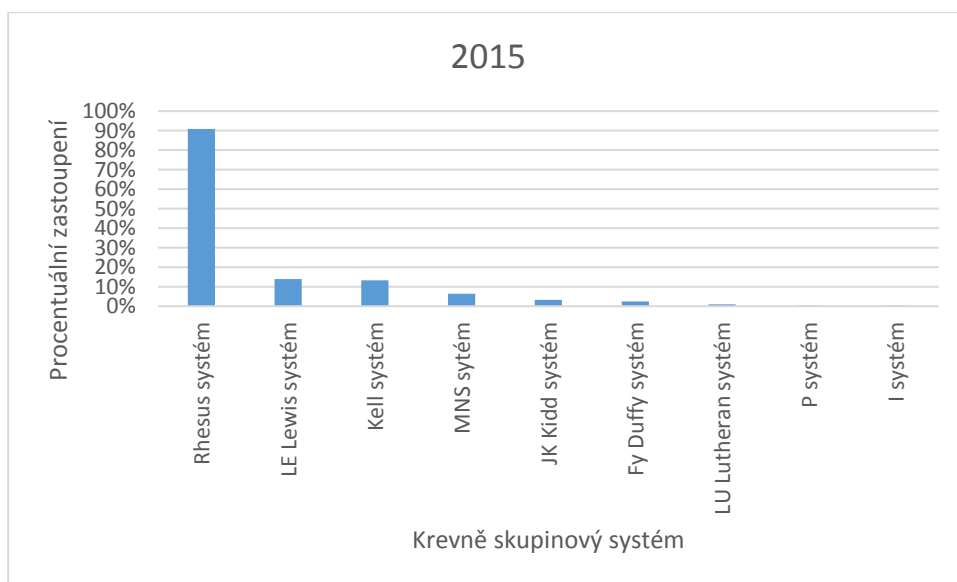
Obrázek 23 Graf 11 Znáznornění frekvence výskytu prokázaných aloprotilátek za rok 2016

Jednotlivé aloprotilátky pochází z různých krevně skupinových systémů. V následující tabulce je vyneseno procentuální zastoupení jednotlivých krevně skupinových systémů dle frekvence výskytu prokázaných aloprotilátek.

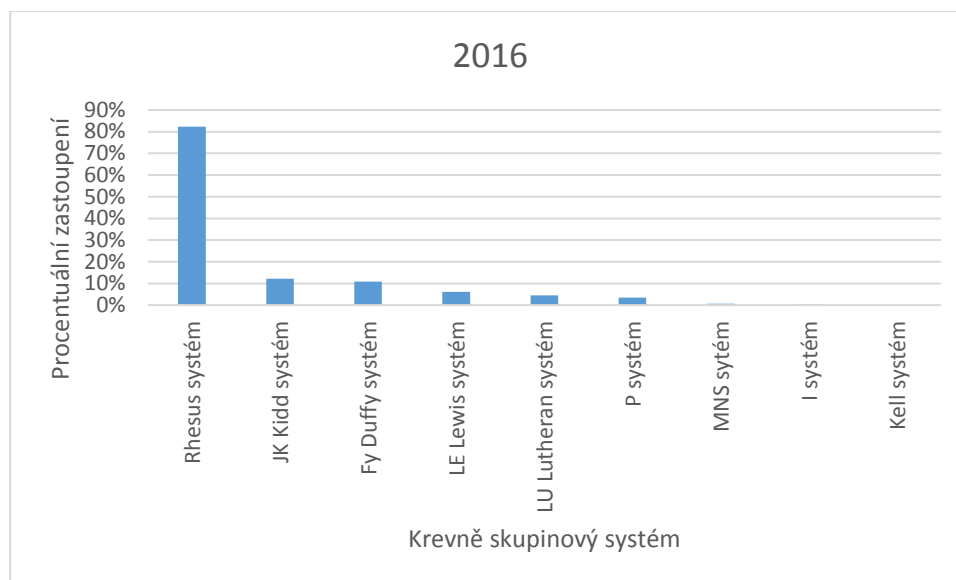
Tabulka 7 Procentuální zastoupení krevně skupinových systémů za rok 2015 a 2016

2015		2016	
Rhesus systém	90,94%	Rhesus systém	82,31%
LE Lewis systém	13,90%	JK Kidd systém	12,24%
Kell systém	13,29%	Fy Duffy systém	10,90%
MNS systém	6,34%	LE Lewis systém	6,12%
JK Kidd systém	3,32%	LU Lutheran systém	4,42%
Fy Duffy systém	2,42%	P systém	3,40%
LU Lutheran systém	0,90%	MNS systém	0,68%
P systém	0,30%	I systém	0,34%
I systém	0,30%	Kell systém	0,00%

Data obsažená v Tabulce 7 jsou vynesena v následujících dvou grafech.



Obrázek 24 Graf 12 Frekvence výskytu aloprotilátek jednotlivých krevně skupinových systémů za rok 2015



Obrázek 25 Graf 13 Frekvence výskytu aloprotilátek jednotlivých krevně skupinových systémů za rok 2016

V grafech 12 a 13 lze vidět, že frekvence výskytu aloprotilátek jednotlivých krevně skupinových za rok 2015 odlišná než za rok 2016. V obou letech je prokázáno nejvíce aloprotilátek z krevně skupinového systému Rh. Množství výskytu aloprotilátek ostatních krevně skupinových systémů je ale rozdílné.

Další tabulka znázorňuje rozdíl mezi součtem prokázaných aloprotilátek a mezi celkovým počtem pozitivních testů na specifické protilátky. Součet jednotlivých aloprotilátek je vyšší než celkový počet provedených vyšetření prokazující specifické protilátky. Tento rozdíl je dán skutečností, že někteří pacienti mají více než jednu prokázanou aloprotilátku. Tato skutečnost se týká například polytransfundovaných pacientů či onkologických a hematoonkologických pacientů u kterých je výskyt většího počtu aloprotilátek dán opakovaným podáváním krevních transfuzí.

Tabulka 8 Rozdíl mezi počtem prokázaných aloprotilátek a počtem pozitivních testů na specifické protilátky

Období	2015	2016
Součet prokázaných aloprotilátek	433	352
Pozitivní test na specifické protilátky	331	294
Rozdíl	102	58
Rozdíl [%]	24%	16%

5.5 Statistické vyhodnocení positivity ET

ET je součástí každého předtransfuzního vyšetření, jako doplňující test. Tento test může udávat falešně pozitivní výsledky, v několika případech je ale aloprotilátka prokázána právě pouze ET.

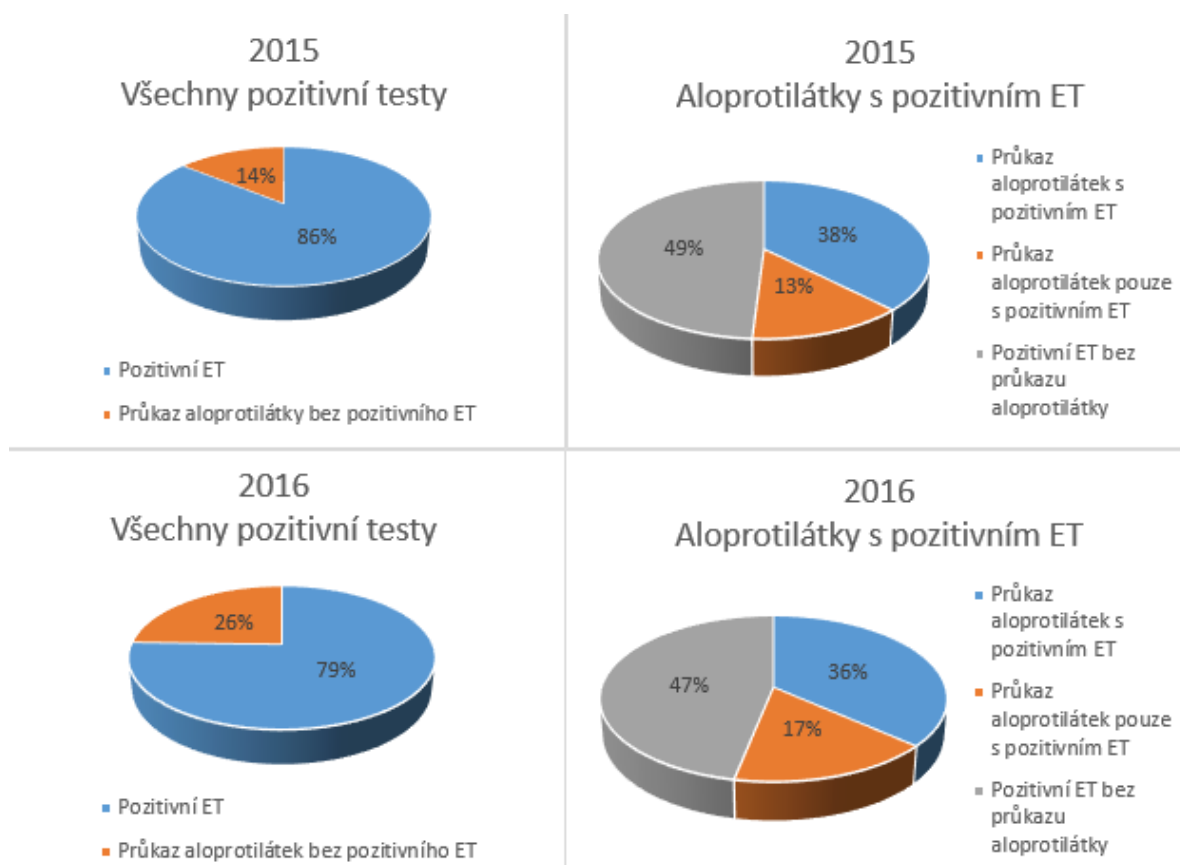
Jak jsme již v předchozích kapitolách zmínili, ze všech pozitivních výsledků více než polovina neprokazuje specifickou aloprotilátku. Jedná se tedy o pozitivní test, kdy zaznamenáváme pouze nespecifické protilátky. Tato skutečnost je dána pozitivitou ET.

V této kapitole tedy zhodnotíme množství pozitivních ET a jejich využití v průkazu aloprotilátek.

Tabulka 9 obsahuje všechna důležitá data týkající se ET, ze kterých vychází následující vyhodnocení. V tabulce můžeme vidět procentuální zastoupení pozitivních ET ze všech pozitivních testů a z testů prokazujících specifické protilátky. Dále je v tabulce zahrnuto množství pozitivních ET, kdy pouze ET prokázal aloprotilátku a také množství vyšetření kdy byla prokázána aloprotilátka bez pozitivního ET. Tyto dvě situace nejsou tak časté, ale jsou velice důležité, zejména varianta, kdy prokazuje aloprotilátku pouze pozitivní ET.

Tabulka 9 Přehled zastoupení pozitivních ET u prokázaných aloprotilátek a u všech pozitivních testů

2015	Získaná data	Zastoupení z pozitivních testů	Zastoupení z prokázaných aloprotilátek	Zastoupení z ET
Celkem vyšetřených pacientů	1254			
Všechny pozitivní testy	713			
Prokázané aloprotilátky	331			
Pozitivní ET	612	86%		100%
Průkaz aloprotilátek bez pozitivního ET	101	14%	31%	
Průkaz aloprotilátek s pozitivním ET	230	32%	69%	38%
Průkaz aloprotilátek pouze s pozitivním ET	82	12%	36%	13%
2016	Získaná data	Zastoupení z pozitivních testů	Zastoupení z prokázaných aloprotilátek	Zastoupení z ET
Celkem vyšetřených pacientů	1239			
Všechny pozitivní testy	594			
Prokázané aloprotilátky	294			
Pozitivní ET	472	79%		100%
Průkaz aloprotilátek bez pozitivního ET	122	21%	41%	
Průkaz aloprotilátek s pozitivním ET	172	29%	59%	36%
Průkaz aloprotilátek pouze s pozitivním ET	79	13%	46%	17%



Obrázek 26 Graf 10, 11, 12, 13 Grafické znázornění k Tabulce 9

Z dat vynesných v Tabulce 9 jsme sestrojili následující grafy, které znázorňují množství pozitivních ET.

Na prvním grafu (Graf 10, 12) je znázorněno množství prokázaných aloprotilátek bez pozitivního ET. Za rok 2015 bylo prokázáno 14 % aloprotilátek bez pozitivního enzymového testu, což je velice malé množství vzhledem k tomu, že u 86 % prokázaných aloprotilátek byl ET pozitivní. Za rok 2016 jsou tato množství mírně odlišná.

Druhý graf (Graf 11, 13) zobrazuje množství pozitivních ET u kterých byla prokázána aloprotilátka. Dále zde můžeme vidět množství pozitivních ET, kdy aloprotilátka prokázána nebyla. Největší množství pozitivních ET, ale neproказuje žádnou aloprotilátku, jedná se tedy o nespecifické protilátky. V roce 2015 se opět množství mírně liší, v obou letech je však množství pozitivních ET bez průkazu aloprotilátky téměř 50 %.

Je zde tedy na místě položit si otázku, jak moc je důležitý či nezbytný ET v předtransfuzním vyšetření a v průkazu aloprotilátek.

6 DISKUZE

Imunohematologie je důležitou součástí oboru transfuziologie. Aby bylo možné podat pacientovi imunologicky kompatibilní krevní transfuzi, je potřeba provést imunohematologická vyšetření, díky kterým lze potvrdit kompatibilitu mezi plazmou/sérem pacienta a erytrocytárních antigenů transfuzního přípravku.

Před vlastním podáním krevní transfuze pacientovi je nutné provést standardní předtransfuzní vyšetření, které zahrnuje několik testů, díky kterým lze zjistit, zda je transfuzní přípravek vhodný pro daného pacienta. V procesu předtransfuzního vyšetření se stanovuje či kontroluje krevní skupina pacienta tedy protilátky z krevně skupinového systému AB0. Tento krevně skupinový systém je nejdůležitějším faktorem pro podání krevní transfuze. Podaná imunologicky nekompatibilní krevní transfuze v krevně skupinovém systému AB0 může mít za následek velice závažné potransfuzní reakce a může způsobit i smrt pacienta. Dalším důležitým faktorem pro podání krevní transfuze je krevně skupinový systém Rh, obzvláště antigen D. Inkompatibilita v různých systémech může mimo jiné nastat také v průběhu těhotenství, kdy imunitní systém matky může začít vytvářet protilátky proti erytrocytárním antigenům plodu, které matčiny erytrocyty neexprimují. Nejčastější je inkompatibilita v AB0 systému a nejzávažnější je v Rh systému (antigen D).

Předtransfuzní vyšetření je prováděno antiglobulinovými testy, enzymovým testem a testem kompatibility. Enzymový test je prováděn jako doplňkový test NAT a PAT. Enzymový test je u většiny předtransfuzních vyšetření pozitivní a není tedy stěžejním testem pro průkaz aloprotilátek. Ve většině případů může ET prokazovat pouze nespecifické protilátky, které jak jsme již zmínili, nejsou klinicky významné.

V případě, že je některý z testů předtransfuzního vyšetření pozitivní, shledáváme u pacienta nepravidelné protilátky. Nepravidelné protilátky nejsou vytvářeny substancemi organismu, ale jsou tvořeny procesem imunizace. V pozitivním testu se mohou vyskytovat tyto nepravidelné protilátky nespecifické, které nejsou klinicky významné a nemají vliv na podání krevní transfuze. Druhou možností je, že se ve vzorku pacienta vyskytují specifické protilátky, které mají zásadní vliv na

podání krevní transfuze. Tyto specifické protilátky neboli aloprotilátky jsou tvořené procesem aloimunizace. Aloprotilátky nepocházejí až na výjimky (anti-A1, A2) z krevně skupinového systému AB0, ale pocházejí z ostatních krevně skupinových systémů (Rh, Kell, Kidd, Duffy apod.). Inkompatibilita krevní transfuze s pacientem může mít za následek velice závažné potransfuzní reakce. Pokud pacient přijme spolu s transfuzí antigen, který není jeho organismu vlastní, tělo začne vytvářet aloprotilátky proti tomuto antigenu, což může mít za následek destrukci erytrocytů. Aloprotilátky z některých krevně skupinových systémů (např. Lewis) může být těžké detekovat, proto je velice důležité, provádět předtransfuzní vyšetření s co nejvyšší opatrností a precizností. K aloprotilátkám vyskytujících se nejčastěji patří například anti-E, anti-Cw, anti-C, anti-K, anti Le(a), anti-Le(b) ad. Nejčastěji tedy zaznamenáváme aloprotilátky pocházející z krevně skupinových systémů Rhesus, Lewis, Kell a Kidd.

Zvýšené riziko tvorby aloprotilátek je dáno opakovaným podáváním krevní transfuze pacientovi. Pacienti trpící některými vrozenými chorobami či onkologičtí a hematoonkologičtí pacienti mohou mít vyšší riziko tvorby aloprotilátek z důvodu vysokého výskytu polytransfundovaných pacientů. S každou krevní transfuzí podanou pacientovi existuje jisté riziko aloimunizace, protože každá krevní transfuze obsahuje různé antigeny. Může tedy být komplikované zajistit polytransfundovaným pacientům s výskytem více aloprotilátek vhodnou krevní transfuzi.

6.1 Kazuistiky

6.1.1 Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících thalasémií, převážně u asijské rasy.

Vývoj hemolytických aloprotilátek a autoprotilátek erytrocytů komplikuje transfuzní terapii u pacientů trpících thalasémií. Byla hodnocena frekvence, příčiny a

prevence této problematiky u 64 pacientů s talasemií (75 % Asiáté). Bylo zjištěno působení fenotypových rozdílů mezi dárce (převážně bílé rasy) a asijskými příjemci na frekvenci aloimunizace (červených krvinek). Bylo provedeno vyšetření dalších imunitních faktorů pacienta. 14 pacientů (22%) ze 64 pacientů (75 % Asiátů) se stalo aloimunizovanými. Pro antigen K, c, S a Fy(b) byl nalezen nesourodý fenotyp RBC mezi bílou populací, včetně většiny dárců, což představuje 38 % aloprotilátek mezi asijskými pacienty. U pacientů, kteří měli splenektomické sérum byla prokázána vyšší míra aloimunizace než u pacientů, kteří splenektomické sérum neměli (36 % vs. 12,8 %). Autoprotilátky erytrocytů, stanovené pozitivním PAT, se vyvinuly u 25 % pacientů tedy u 16 pacientů z 64 pacientů, což způsobilo těžkou hemolytickou anemii u 3 z 16 pacientů. Z těchto 16 pacientů byly protilátky u 11 pacientů prokázány IgG imunoglobulinem a u 5 pacientů imunoglobulinem IgM. Červené krvinky měly abnormální profily deformace, které byly výraznější u pacientů bez sleziny, což pravděpodobně stimulovalo tvorbu protilátek. Bylo prokázáno, že krevní transfuze fenotypově kompatibilní krve systémů RhD a Kell, ve srovnání s fenotypově kompatibilní krví systému AB0, byla účinná při prevenci aloimunizace (2,8 % vs. 33 %). Aloimunizace a autoimunizace jsou běžné a závažné komplikace u pacientů asijské rasy trpících talasemií, kteří jsou postiženi nesourodým množstvím antigenu RBC od příjemce a imunologickými faktory. (13)

6.1.2 Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících talasemií, převážně u arabské rasy

Thalasémie je relativně běžná hemoglobinopatie v oblasti Arabského zálivu. Jsou ovšem k dispozici pouze omezené údaje o frekvenci výskytu aloimunizace a autoimunizace krvetvorby u pacientů trpících talasemií závislých na krevní transfuzi.

Celkem 190 pacientů se závažnou talasemií bylo klasifikováno jako kuvajtští příslušníci arabské rasy a na ostatní. Byly přezkoumány záznamy o

předtransfuzním vyšetření na přítomnost RBC aloprotilátek a autoprotilátek a věk, ve kterém byly RBC aloprotilátky vyvinuty.

U 57 (30%) pacientů byla prokázána novotvorba RBC aloprotilátek. Nejběžnější klinicky významné aloprotilátky byly namířeny proti antigenům z krevně skupinových systémů Kell a RhD. Aloprotilátka anti-K se začala vytvářet u 41 (72%) pacientů, po nichž následovala aloprotilátka anti-E u 26 (45,6%). RBC autoprotilátky byly vytvořeny u 21 (11%) pacientů. U 66 (49,6%) pacientů se vytvořily RBC protilátky ve věku od 2 do 10 let.

Vysoké hodnoty aloimunizace a vysoké rychlosti autoimunizace, pozorovaných v této studii, mohly být ovlivněny několika faktory, jako například heterogenitou populace žijící v Kuvajtu, nedostatkem vhodných dárců pro tyto pacienty a použitím krve, která byla deleukotizována. Doporučuje se, aby pacienti s thalasémií dostávali krevní transfuze kompatibilní s antigeny RhD a Kell. (14)

6.1.3 Aloimunizace a erytrocytární autoimunizace u pacientů na transfuzi závislých, trpících thalasémií, převážně u pacientů pocházejících z Egypta

Thalasémie je považována za nejčastější hemoglobinopatii v Egyptě a je zde jedním z hlavních zdravotních problémů. Celoživotní transfúze červených krvinek (RBC) zůstává hlavní léčbou těžkých forem, avšak aloimunizace RBC se projevuje jako komplikace pravidelných transfuzí kvůli opakované expozici cizím antigenům. Cílem bylo porovnat frekvenci aloprotilátek u skupiny pacientů s omezeným počtem dárců a těmi, kteří dostávali krevní transfuze od více dárců, mezi egyptskými pacienty trpícími talasémií a jsou závislí na krevní transfuzi.

Bylo studováno celkem 235 pacientů s talasémií, pravidelně přijímajících krevní transfuze. Z nichž 36 bylo mělo omezený počet dárců. Všichni pacienti byli vyšetřováni na přítomnost RBC autoprotilátek a aloprotilátek, následovaný identifikací aloprotilátek u pozitivních pacientů.

U 46 (19,5%) pacientů byla prokázána novotvorba RBC aloprotilátek. Nejběžnější klinicky významné aloprotilátky byly namířeny proti antigenům ze systémů Kell a

RhD. Vývoj aloprotilátek byl spojen s vyšším věkem, vyšší frekvencí podaných krevních transfuzí a splenektomií. Nižší počet aloimunizace byl prokázán ve skupině s omezeným počtem dárců, kde bylo 8,3 % (3/36) pacientů aloimunizováno ve srovnání s 21,6 % (43/199) pacienty, kteří dostávali krevní transfuze od více dárců.

Vyšetření donorových RBC za přítomnosti antigenů Kell a Rh (E) před transfuzí může pomoci snížit vznik aloimunizace. Pro posuzování frekvence produkce aloprotilátek u pacientů s omezeným počtem dárců je zapotřebí dalších a podrobnějších studií. (15)

7 ZÁVĚR

Primárním cíle této práce bylo zmapovat míru výskytu aloprotilátek u pacientů, kterým byla podána krevní transfuze ve FN Motol. Tato analýza byla vytvořena pro rok 2015 a 2016. Ze získaných dat jsme tedy mohli porovnat rozdíly mezi rokem 2015 a 2016. V roce 2015 bylo provedeno 1254 vyšetření, z tohoto počtu vyšel pozitivní test na specifické či nespecifické protilátky u 713 pacientů. Z těchto pacientů byla prokázána aloprotilátka u 331 pacientů. Výskyt aloprotilátek byl nejčtenější u krevně skupinového systému RhD, a to celkem u 91 % pacientů s pozitivním vyšetřením. Druhým krevně skupinovým systémem s největším zastoupením aloprotilátek byl systém Lewis (14 %) a třetím byl systém Kell (13 %). Ostatní prokázané aloprotilátky pocházeli z krevně skupinových systémů MNSs (6 %), Kidd (3 %), Duffy (2 %), Lutheran (1 %), P (0,30 %) a I (0,30 %). V roce 2016 bylo provedeno celkem 1239 vyšetření, z tohoto počtu byly testy pozitivní na specifické či nespecifické protilátky u 594 pacientů. U 294 pacientů, ze všech pozitivních vyšetření byla prokázána aloprotilátka. Krevně skupinovým systémem, ze kterého pocházel největší počet prokázaných aloprotilátek byl systém RhD (82 %), druhým nejzastoupenějším systémem byl systém Kell (12 %) a jako třetí systém s nejhojnějším zastoupením prokázaných aloprotilátek byl systém Lewis (11 %). Dalšími krevně skupinovými systémy, ze kterých pocházeli prokázané aloprotilátky byly systémy MNSs (6 %), Duffy (4 %), Kidd (3 %), Lutheran (0,70 %) a I (0,30 %). Lze tedy s jistotou konstatovat, že výskyt aloprotilátek u příjemců transfuze ve FN Motol je poměrně vysoký, což je dáno spektrem pacientů. Mnozí z nich jsou polytransfundovaní chronicky (hematoonkologičtí, onkologičtí a pacienti s chronickými chorobami) a velkému množství pacientů je podáno větší množství transfuzních přípravků v krátké době (polytraumata, kardiochirurgické a velké ortopedické výkony, transplantace plic u dospělých a ledvin a srdce u dětí).

Druhotným cílem této práce bylo posoudit účelnost enzymového testu v předtransfuzním vyšetření. V roce 2015 byl ET ze všech pozitivních vyšetření (713) pozitivní u 612 pacientů (86 %), z toho prokázal aloprotilátku pouze ET u 82

pacientů (12 %). U 101 pacientů (14 %) ze všech pozitivních vyšetření, byla prokázána alopřítelátka bez pozitivního enzymového testu. V roce 2016 byl ET pozitivní u 472 pacientů (79 %), ze všech pozitivních vyšetření (594). U 79 pacientů (13 %), ze všech pozitivních ET, byla prokázána alopřítelátka pouze pozitivním ET. U 122 pacientů (20 %) byla alopřítelátka prokázána bez pozitivního ET. Nelze tedy jednoznačně říci, zda je enzymový test účelný či ne. Jeho používání s sebou nese zvýšené finanční náklady na laboratorní diagnostiku (řádově v desítkách procent) a následná identifikace přítelátek u pozitivních výsledků screeningu přítelátek nepřináší žádný benefit pro pacienta, avšak u některých skupin pacientů lze jeho používání zcela zdůvodnit z důvodu citlivější detekce přítelátek (dětské hematoonkologické a onkologické pacienti). Pracoviště FN Motol se prozatím přiklání k rutinnímu využívání dvoustupňových enzymových testů s ohledem na specializované skupiny pacientů.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka (antibody)
Ag	antigen
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
C1	komplement C1-C9 složky komplementu
C	antigen systému Rhesus
c	antigen systému Rhesus
Cw	antigen systému Rhesus
D	antigen systému Rhesus
E	antigen systému Rhesus
e	antigen systému Rhesus
EBR	erytrocyty bez buffy-coatu
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fy(a)	antigen systému Duffy
Fy(b)	antigen systému Duffy
Hb	hemoglobin
HON	hemolytické onemocnění plodu/novorozence
I	antigen systému I
HTR	hemolytická potransfuzní reakce
Ig	imunoglobulin
Jk(a)	antigen systému Kidd
Jk(b)	antigen systému Kidd
K	antigen systému Kell
k	antigen systému Kell
Kp(a)	antigen systému Kell
Le(a)	antigen systému Lewis
Le(b)	antigen systému Lewis
Lu(a)	antigen systému Lutheran

Lu(b)	antigen systému Lutheran
M	antigen systému MNSs
MAC	komplex proteinů C5b, C6, C7, C8, C9
NAT	nepřímý antiglobulinový test
P	antigen systému P
PAT	přímý antiglobulinový test
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RBC	erytrocyty
Rh	skupinový systém Rhesus
RhD	antigen D systému Rh
S	antigen systému MNSs
s	antigen systému MNSs

9 CITOVANÁ LITERATURA

1. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST. Transfuzní lékařství. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
2. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0..
3. FÁBRYOVÁ, Viera. *Imunohematológia a transfúzna medicína pre prax*. Praha : Grada, 2012. ISBN 978-80-247-4391-2.
4. PROCHÁZKOVÁ Renata, Lenka ŘEHOŘOVÁ. *Klinická transfuziologie pro všeobecné sestry*. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2010. ISBN 978-80-7372-676-8.
5. ENGELFRIET, C.P. a A.J. MEULENBROEK. *Imunohematologie 1*. Amsterdam : Sanquin Reagents, 2003. ISBN 90-5267-029-3.
6. ČERMÁKOVÁ Zuzana, Martin KOŘÍSTKA, Alena MALUŠKOVÁ. *Imunohematologie*. Ostrava : Ostravská univerzita v Ostravě, 2008. ISBN 978-80-7368-600-0.
7. Jiří Masopust, Martin Písačka. *Praktická imunohematologie: erytrocyty*. Praha : Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3740-2.
8. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
9. INDRÁK, Karel, ed. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha : Triton, Lékařské repetitorium, 2014. ISBN 978-80-7387-722-4.

10. DANIELS, Geoff. *Human blood groups*. 2nd. Oxford : Blackwell science, 2013. ISBN 0632056460.
11. Chladové aglutininy. *Labtestonline*. [Online] 06. 10 2014.
http://www.labtestonline.cz/tests/chladov_aglutininy.html?tab=2.
12. banky, Oddělení krevní. *Záznamy imunohematologických vyšetření*. Praha : FN Motol, 2016-2017.
13. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *National Center for Biotechnology Information*. [Online]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071629>.
14. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617321>.
15. National Center for Biotechnology Information. *Red blood cell alloimmunization in transfusion-dependent Egyptian patients with thalassemia in a limited donor exposure program*. [Online] Copyright © 2011 American Association of Blood Banks. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745214>.
16. Šušolíková, MUDr. Anna. alphamedical.sk. *Alpha medical*. [Online] Copyright © Alpha medical, s. r. o., 29. 04 2017. <https://www.alphamedical.sk/casopis-invitro/podtriedy-imunoglobinov-igg-teoria-vyuzitie-v-praxi>.
17. Requirement for complement in antibody responses is not explained by the classic pathway activator IgM . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Online] Copyright ©.
<http://www.pnas.org/content/108/43/E934/1/F7.expansion.html>.

18. *DataSpell Archives*. [Online] Copyright © , 05 2015.
<https://dataspellarchives.blogspot.cz/2015/05/>.
19. Fujita, Teizo. Figure 1 : Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity : *Nature Reviews Immunology*. *Nature Research: science journals, jobs, information and services*. [Online] 05 2002.
http://www.nature.com/nri/journal/v2/n5/fig_tab/nri800_F1.html.
20. ISBT: Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. *ISBT: Home*. [Online] 17. 02 2017. <http://isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>.
21. Sláviková M., Holusková I., Galuszková D. Imunohematologie a vyšetřovací metody v imunohematologii. *Transfuzní oddělení FN Olomouc*. [Online] Copyright © , 12 2016. <http://docplayer.cz/25563499-Imunohematologie-a-vysetrovaci-metody-v-imunohematologii-slavikova-m-holuskova-i-galuszkova-d-transfuzni-oddeleni-fn-olomouc.html>.
22. Coombsův test. *WikiSkripta*. [Online]
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Coombs%C5%AFv_test.
23. PubMed. *National Center for Biotechnology Information*. [Online]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161355>.
24. Krevní transfuze. *Wikiskripta*. [Online]
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Krevn%C3%AD_transfuze.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Stavba imunoglobulinu (9)	18
Obrázek 2 Strukturní části imunoglobulinu (8).....	19
Obrázek 3 Typy imunoglobulinů (11).....	20
Obrázek 4 Nekovalentní vazebné síly (2)	21
Obrázek 5 Schéma tří variant aktivace komplementového systému (12)	23
Obrázek 6 Grafické znázornění tří variant reakce vazby komplementu (13).....	24
Obrázek 7 Aktuální seznam krevně skupinových systémů (16)	27
Obrázek 8 K erytrocytům s antigenem je přidána protilátka proti antigenu, která se váže na erytrocyty, která mají na povrchu specifické antigeny. Tím dochází k aglutinaci erytrocytů, eventuálně k aktivaci komplementu. (17)	35
Obrázek 9 Schéma přímého antiglobulinového testu (18)	35
Obrázek 10 Schéma nepřímého antiglobulinového testu (18).....	36
Obrázek 11 Princip aglutinace při enzymovém testu (17)	37
Obrázek 12 Kompatibilita krevně skupinových systémů AB0 a RhD (19)	37
Obrázek 13 Graf 1 Graf k tabulce 1	40
Obrázek 14 Graf 2 Graf k tabulce 2 – zastoupení jednotlivých prokázaných aloprotilátek za rok 2015 a 2016.....	41
Obrázek 15 Graf 3 Znázornění rozdílu mezi počtem pozitivních testů u dětí a dospělých	42
Obrázek 16 Graf 4 Znázornění počtu pozitivních vyšetření u mužů a žen za rok 2015 a 2016	43
Obrázek 17 Graf 5 Znázornění pozitivních vyšetření dle věkové kategorie dětí za rok 2015 a 2016	43
Obrázek 18 Graf 6 Porovnání pozitivních a negativních testů ze všech provedených vyšetření za rok 2015.....	45
Obrázek 19 Graf 7 Porovnání pozitivních a negativních testů ze všech provedených vyšetření za rok 2016.....	45

Obrázek 20 Graf 8 Zastoupení prokázaných protilátek ze všech pozitivních testů za rok 2015	46
Obrázek 21 Graf 9 Zastoupení prokázaných protilátek ze všech pozitivních testů za rok 2016	47
Obrázek 22 Graf 10 Znázornění frekvence výskytu prokázaných aloprotilátek za rok 2015	49
Obrázek 23 Graf 11 Znázornění frekvence výskytu prokázaných aloprotilátek za rok 2016	49
Obrázek 24 Graf 12 Frekvence výskytu aloprotilátek jednotlivých krevně skupinových systémů za rok 2015.....	50
Obrázek 25 Graf 13 Frekvence výskytu aloprotilátek jednotlivých krevně skupinových systémů za rok 2016.....	51
Obrázek 26 Graf 10, 11, 12, 13 Grafické znázornění k Tabulce 7	54

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Množství jednotlivých provedených vyšetření za rok 2015 a 2016	
.....	Chyba! Záložka není definována.
Tabulka 2 Zjištěné aloprotilátky za rok 2015 a 2016.....	41
Tabulka 3 Přehled počtů dospělých a dětí z pozitivních vyšetření	42
Tabulka 4 Množství všech provedených vyšetření a množství pozitivních a negativních vyšetření	Chyba! Záložka není definována.
Tabulka 5 Zastoupení specifických, nespecifických a chladových protilátek ze všech pozitivních vyšetření za rok 2015 a 2016	46
Tabulka 6 Seznam prokázaných aloprotilátek za rok 2015 a 2016	48
Tabulka 7 Procentuální zastoupení krevně skupinových systémů za rok 2015 a 2016	50
Tabulka 8 Rozdíl mezi počtem prokázaných aloprotilátek a počtem pozitivních testů na specifické protilátky	51
Tabulka 9 Přehled zastoupení pozitivních ET u prokázaných aloprotilátek a u všech pozitivních testů	53